ÜBER STRUKTUR UND WIRKUNG ALDEHYDISCHER ABBAUPRODUKTE VON VALEPOTRIATEN

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim

Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

zu Frankfurt am Main

von

JÖRG VEITH

aus Bad Homburg

Frankfurt am Main 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523704_0039

ÜBER STRUKTUR UND WIRKUNG ALDEHYDISCHER ABBAUPRODUKTE VON VALEPOTRIATEN

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim

Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

zu Frankfurt am Main

von

JÖRG VEITH

aus Bad Homburg

Frankfurt am Main 1983

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
zu Frankfurt am Main

Dekan:	Prof. Dr. Dr. E. Mutschler
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Schneider
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. B. Lemmer
Tag der Promotion:	17.11.1983

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Prof. Dr. G. Schneider angefertigt. Meinem verehrten Lehrer und Doktorvater

Herrn Professor Dr. G. Schneider

danke ich herzlich für sein stetes Interesse an meiner Arbeit und deren großzügige Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. B. Lemmer, Zentrum der Pharmakologie, für die zur Verfügungstellung eines Arbeitsplatzes für die Motilitätsversuche sowie für wertvolle Diskussionen und Anregungen für meine Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Mutschler, Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, möchte ich für sein freundliches Entgegenkommen danken, die Einrichtungen seines Instituts benutzen zu dürfen.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. H. Linde, Institut für Pharmazeutische Chemie, für die Aufnahme und Auswertung der ^{1}H-NMR- und Massenspektren und die hilfreichen Diskussionen.

Ebenso danke ich Herrn Dr. G. Zimmermann, Institut für Organische Chemie, für die Aufnahme und Auswertung der ^{13}C-NMR-Spektren und die wertvollen Diskussionen.

Last not least danke ich Herrn Dr. M. Willems, Institut für Pharmazeutische Biologie, für hilfreiche Diskussionen und Anregungen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einführung und Problemstellung	1
II. Allgemeiner Teil	4
1. Vorkommen und Chemie der Valepotriate	4
2. Wirkungen der Valepotriate	11
3. Chemie und Wirkungen der Abbauprodukte	17
III. Spezieller Teil	21
1. Isolierung der Valepotriate	21
2. Isolierung und Identifizierung von K5 und von K6, einem neuen Produkt des Thermoabbaus von Valtratum	24
3. Isolierung und Identifizierung von K4, einem neuen Produkt des Thermoabbaus von Didrovaltratum	36
4. Physikochemische Eigenschaften einiger aldehydischer Abbauprodukte der Valepotriate	44
5. Pharmakologische Eigenschaften	46
a. Akute Toxizität	46
b. Die Beeinflussung der Motilität bei der Maus	47
α. Die Beeinflussung der motorischen Aktivität nach intraperitonealer Applikation der Testsubstanzen	50
β. Die Beeinflussung der motorischen Aktivität nach peroraler Applikation der Testsubstanzen	63
c. Prüfung auf antagonistische Effektivität von K4 gegenüber Acetylcholin und Histamin	71
6. Allgemeine Diskussion und Besprechung der Ergebnisse	72
7. Zusammenfassung	85

Seite

IV. Experimenteller Teil 88

1. Chromatographische Methoden 88
2. Herkunft, Trocknung und Lagerung der untersuchten Droge 89
3. Isolierung der Valepotriate 90
4. Bildung und Isolierung der Abbauprodukte 92
5. Darstellung des 2,4-Dinitrophenylhydrazons von K6 95
6. Physikalische Untersuchungsmethoden 95
7. Pharmakologische Untersuchungen 97

V. Literaturverzeichnis 102

I. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Der Baldrian (Valeriana officinalis L.s.l.) ist eine der ältesten bekannten Heilpflanzen. Dieser wurde früher vor allem als Antiepilepticum sowie in der Volksheilkunde als Diuretikum, Fieber- und Wurmmittel verwendet (TSCHIRCH, 1912). Die Verwendung des Baldrians als Sedativum trat aber erst Mitte des 18. Jahrhunderts in den Vordergrund (BERGER, 1960). Während noch 1873 GRISA in seiner Dissertation das ätherische Öl als alleinigen Träger der sedativen Wirkung auffaßte, fand WALLICZEWSKY 1891 mit den Alkaloiden Chatinin und Valerin im Tierversuch ebenfalls sedierende Substanzen im Baldrian. Später isolierte CIONGA (1935) aus frischen Baldrianwurzeln α-Methylpyrrylketon, das bei pharmakologischen Prüfungen eine starke Verminderung der Reizbarkeit der nervösen Zentren hervorrief. Ebenfalls aus der frischen Wurzel gewannen STOLL et al. (1957) Valerensäure, die aber nur beim Frosch eine sedative Wirkung zeigte. Auf den Warmblüter übte sie keine beruhigende Wirkung aus. Außer einem Ester des ätherischen Öls, dem Bornylisovalerianat, der unter dem Namen Bornyval 1904 in den Handel gebracht wurde und in den zwanziger Jahren wieder zurückgezogen wurde, gelangten aber keine Monosubstanzen aus dem Baldrian als Sedativum in den Handel sondern nur Extrakte in verschiedenen galenischen Zubereitungen. Auch das Bornylisovalerianat findet sich heute nur noch als Bestandteil des Perozon® Baldrian-Ölbads als externes Sedativum im Handel.

HAFFNER (1929) versuchte eine Standardisierung der sedativen Wirkung von verschiedenen Baldrian-Präparaten durch Ermittlung der Toxizitätsgrenze bei Mäusen, indem er die sogenannte Baldrian-Mäuse-Einheit (BME) bestimmte. Die BME wurde dann zur Grundlage für die Ermittlung von therapeutischen Dosen beim Menschen. Doch trotz Anwendung hoher Dosen von 600-800 BME konnte WAGNER (1942) keinen Einfluß auf die Schlafdauer von schlafgestörten Versuchspersonen feststellen. Auch BRACKEN und WEIDEMANN (1953) prüften die Wirkung eines Baldrian-Extrakts in Drageeform (1 Drg. = 33 BME) durch das "Flimmerverfahren" an Versuchspersonen und konnten dabei keine dosisabhängigen zentral sedierenden Effekte erkennen. Trotz gegentei-

liger Befunde wie die von RENNER (1937), WERZ und HOMAN (1939) und SCHROTTENBACH (1931) verlor der Baldrian gegen Mitte dieses Jahrhunderts an therapeutischer Bedeutung. Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der klinischen Prüfungen könnten darin zu suchen sein, daß in den Baldrianzubereitungen die beschriebenen sedativ wirksamen Inhaltsstoffe nur in so geringen Mengen vorhanden sind, daß sie für das Zustandekommen einer sedativen Wirkung mengenmäßig nicht ausreichen dürften (HAUSCHILD, 1956).

Mit den von THIES (1966) aus Valerianaceen isolierten Valepotriaten, die in der Baldrianwurzel in vergleichsweise großer Menge (1-2%) vorkommen, wurden erstmals Substanzen beschrieben, die in größerer Menge zur Verfügung standen und als Monosubstanzen klinisch geprüft werden konnten.

Die Valepotriate sind vergleichsweise instabil; sie tragen wahrscheinlich erheblich zur Bildung von Artefakten in der Droge und in deren galenischen Zubereitungen bei. Daß bestimmte Valepotriat-Artefakte pharmakologisch wirksam sind, machte die Arbeitsgruppe von WAGNER wahrscheinlich. Die Autoren wiesen für Didrovaltratum und Valtratum im Tierversuch nach oraler Gabe eine gute motilitätshemmende Effektivität nach (WAGNER et al., 1980) und fanden neben einer mäßigen Resorptionsrate einen schnellen Abbau der Verbindung im Magen-Darm-Trakt (WAGNER und JURCIC, 1980). Dieser Befund wurde als Hinweis auf die Beteiligung von Abbauprodukten an der Wirkung gedeutet. WAGNER et al. (1980) stellten außerdem fest, daß niedrige Dosen (100 mg/kg) gelagerter Tinktur bei peroraler Gabe eine stärkere sedierende Wirkung zeigten als frische Tinktur. Da die Tinktur die genuinen Substanzen bereits nach kurzer Zeit kaum mehr enthält (SCHILD, 1969; GRAF und BORNKESSEL, 1978) könnte deren Wirkung ebenfalls teilweise auf Artefakten der Valepotriate beruhen. WAGNER et al. (1980) sowie SCHNEIDER und WILLEMS (1982) erhoben erstmals konkrete Befunde über die motilitätshemmende Wirkung der Valepotriat-Artefakte Homobaldrinal bzw. Desacylbaldrinal, Baldrinal und Valtroxal. Die Untersuchungen erbrachten außerdem die wichtige Aussage, daß die charakteristischen Strukturelemente der Vale-

potriate (Epoxigruppe, dreifache Acylierung) nicht zu den Wirkgruppen dieser Moleküle gehören. Auch durch den Nachweis einer sedierenden Wirkung des epoxidringfreien Acetoxyvaltratumhydrins bei Mäusen durch HÖLZL et al. (1976) wird diese Aussage unterstützt. Die Motilitätshemmung war im Vergleich zu Valtratum allerdings schwächer (FINK, 1982).

Baldrinal, Desacylbaldrinal und Valtroxal sowie als weiteres Artefakt Homobaldrinal sind Produkte eines mehr oder weniger sauren Abbaues der Valepotriate Valtratum und Isovaltratum (THIES, 1967; WILLEMS, 1980; SCHNEIDER und WILLEMS, 1982). Da die vier Verbindungen nicht in nennenswerten Mengen in Droge sowie Tinktur vorkommen und offenbar auch nicht temporär in Erscheinung treten, dürfte der Säureabbau für die normale Artefaktbildung nebensächlich sein.

Einen interessanten Hinweis, die Artefaktbildung auf anderen Wegen zu provozieren, gibt die Vorschrift zur Herstellung der Tinktura Valerianae in der Pharmacopoea Helvetica V (1953). Hiernach erfolgt die Extraktion der Droge mit Ethanol in der Siedehitze wobei mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls Zersetzungen der Valepotriate zu erwarten sind. Durch Modifikation dieser Vorschrift sollte nach Thermoabbauprodukten der Valepotriate gesucht werden. Soweit sich neue Strukturen ergeben und die erhaltenen Mengen es zuließen, waren pharmakologische Prüfungen vorgesehen. Diese sollten sich hauptsächlich auf die Beeinflussung der Motilität von Mäusen während ihrer diurnalen Aktivitätsphase erstrecken.

II. ALLGEMEINER TEIL

1. Vorkommen und Chemie der Valepotriate

a. Vorkommen:

Nach WAGENITZ im Syllabus der Pflanzenfamilien (ENGLER, 1964) wird die Familie der Valerianaceae in die drei Trieben Valerianeae, Patrinieae und Triplostegieae unterteilt. Bei diesen konnten bisher Valepotriate nur im Tribus Valerianeae der europäischen und indischen Arten von Centranthus, Fedia, Valeriana und Valerianella (STAHL und SCHILD, 1971) sowie der südamerikanischen Arten Aretiastrum, Astrephia, Belonanthus, Phyllactis, Stangea und Valeriana (SCHILD und SEITZ, 1971) nachgewiesen werden. Die Valepotriate stellen daher ein spezifisches Merkmal des Tribus Valerianeae dar.

Die Valepotriate wurden nicht nur in Rhizom und Wurzel nachgewiesen, sondern auch in den oberirdischen Organen. So berichten FUNKE und FRIEDRICH (1975) sowie HÖLZL und JURCIC (1975) erstmals über das Vorkommen von Valepotriaten in Stengeln und Blättern mehrerer Valerianaceen. Aufgrund von DC-Untersuchungen zeigten sich dabei sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede der Valepotriate in den einzelnen Pflanzenteilen.

Unter den europäischen Valerianaceen-Arten weisen die unterirdischen Organe der roten Spornblume (Centranthus ruber DC.) mit etwa 3% Valepotriaten den höchsten Gehalt auf (LAUFER et al., 1970); HÖLZL, 1975) und sind daher zu deren Gewinnung sehr geeignet.
In neuerer Zeit konnten BECKER und SCHRALL (1980) von zwei Valerianaceen in Zellkultur die Bildung von Valepotriaten nachweisen. Sie fanden sogar teilweise eine höhere Akkumulation von Valepotriaten als in den intakten Pflanzen.

b. Chemie:

Die Bezeichnung dieser Naturstoffgruppe leitet sich nach THIES (1966) von Valeriana-Epoxi-Triester ab. Das Monoterpenskelett der Valepotriate bildet sich nach einem von HÖLZL (1975) aus Analogieschlüssen bei der Iridoidbiosynthese aufgestelltem Schema aus dem Iridodial, das zum 4,8-Dimethylpenta(c)-pyranringsystem cyclisiert (Abb. 1). Den Valepotriaten sind neben dem partiell hydrierten Grundgerüst der 8,10-Oxiranring (Epoxid) oder die 8,10-Diolgruppierung und drei bzw. vier veresterte alkoholische Hydroxygruppen an den C-Atomen 1,7,11 bzw. 10 gemeinsam. Man unterscheidet zwei Grundtypen: den Monoentyp (Didrovaltratumreihe) und den Dientyp (Valtratumreihe) (Abb. 2). Die Verbindungen lassen sich schon auf der DC-Platte mit Fluoreszenzindikator unterscheiden.

Während Monoen-Typen sich im UV nicht zu erkennen geben, sind die Dientypen durch Fluoreszenzminderung sichtbar. Die Monoene lassen sich erst nach Anwendung von Sprühreagenzien wie z.B. Dinitrophenylhydrazin-Eisessig-Salzsäure (DNPH) durch Farbbildung nachweisen.

Wie grundlegende Untersuchungen zur Konfiguration der Valepotriate von THIES et al. (1973) zeigten, ist Valtratum und Didrovaltratum eine 1-β,7-β-Diacyloxy-8-β-methylen-9-β-H-Konfiguration gemeinsam; das H-5 bei Didrovaltratum ist β-ständig. Es liegt daher nahe, allen von diesen beiden Grundtypen abgeleiteten Valepotriaten und Abbauprodukten die gleiche Konfiguration zuzuordnen. Die Valepotriate sind optisch aktive Verbindungen mit unterschiedlichem Drehsinn und je nach Typ unterschiedlicher Anzahl an Chiralitätszentren.

Abb. 1: Möglicher Biosyntheseweg der Valepotriate modifiziert nach HÖLZL (1975) und INOUYE et al. (1977)

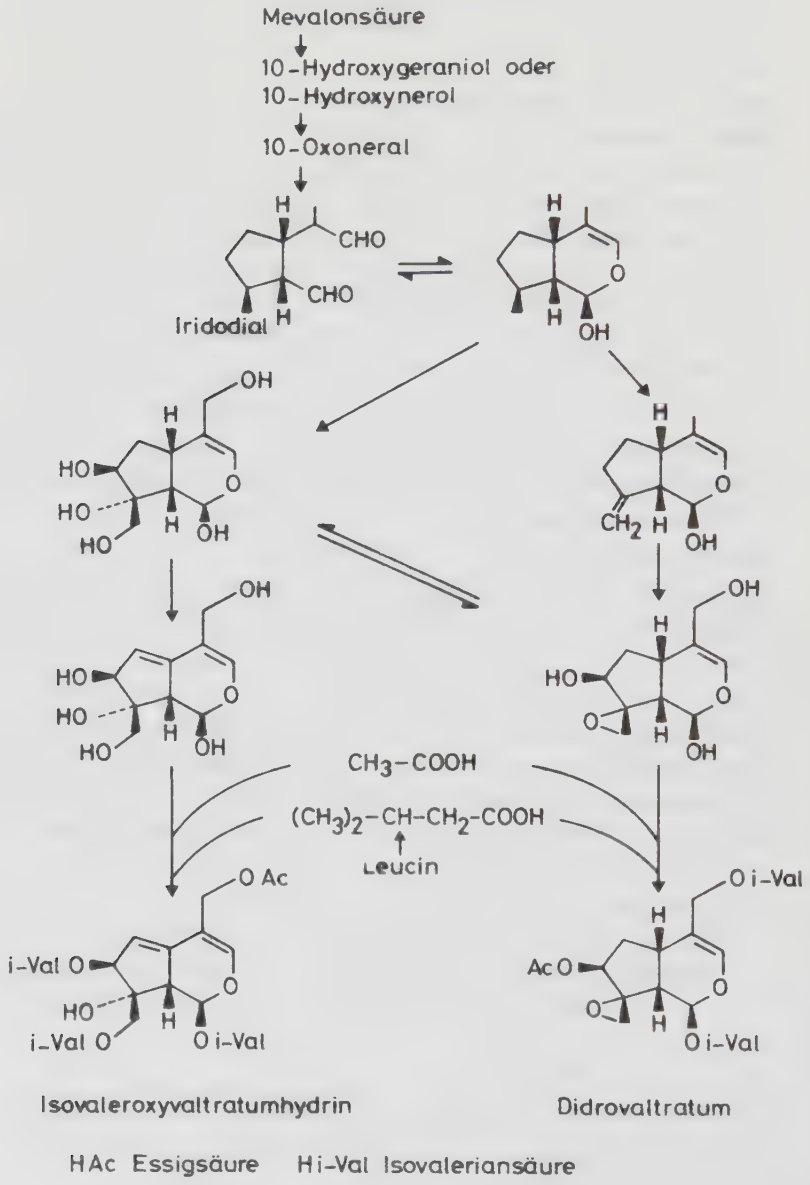
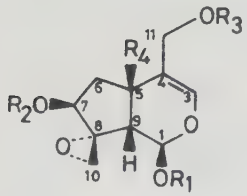
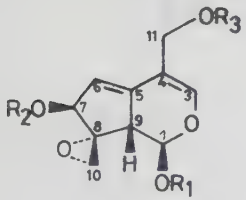


Abb. 2: Struktur der Valepotriate mit 8,10-Oxiranring



Monoen-Typ

		R_1	R_2	R_3	R_4
Didrovaltratum	(THIES,1966)	i-Val	Ac	i-Val	H
Homodidrovaltratum	(THIES,1968)	β-Me-Val	Ac	i-Val	H
IVHD-Valtratum	(SCHILD,1969)	i-Val	Ac	α-OAc-i-Val	OH
AHD-Valtratum	(HANDJEVA et al.,1978)	α-OAc-i-Val	i-Val	Ac	OH
Isodidrovaltratum	(KUCABA et al.,1980)	i-Val	i-Val	Ac-Val	H



Dien-Typ

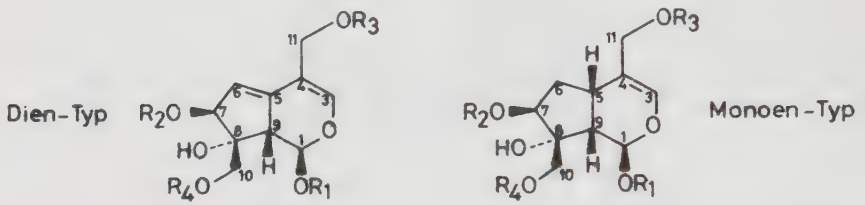
		R_1	R_2	R_3
Valtratum	(THIES,1966)	i-Val	i-Val	Ac
Acevaltratum	(THIES,1966)	i-Val	β-OAc-i-Val	Ac
Isovaltratum	(THIES,1967)	i-Val	Ac	i-Val
Homoacevaltratum	(THIES,1968)	i-Val	(β-OAc-β-Me)-Val	Ac
DIA-Valtratum	(HANDJEVA,ZAIKIN,1978)	Ac	i-Val	Ac
1-Homovaltratum	(THIES et al.,1981)	β-Me-Val	i-Val	Ac
7-Homovaltratum	(THIES et al.,1981)	i-Val	β-Me-Val	Ac
1-α-Acevaltratum	(THIES et al.,1981)	α-OAc-i-Val	i-Val	Ac
11-α-Aceisovaltratum	(THIES et al.,1981)	i-Val	Ac	α-OAc-i-Val

Veresterte Säuren:

Ac	Essigsäure
i-Val	Isovaleriansäure
β-Me-Val	β-Methylvaleriansäure
α-OAc-i-Val	α-Acetoxyisovaleriansäure
β-OAc-i-Val	β-Acetoxyisovaleriansäure
β-OAc-β-Me-Val	β-Acetoxy-β-Methylvaleriansäure

Bei den von HÖLZL et al. (1976) aus Valeriana tiliaefolium TROITZKY isolierten genuinen Valtrathydrinen ist der Oxiranring nicht mehr vorhanden; anstelle dessen liegt eine 1,2-Diolmonoesterstruktur vor (Abb. 3).

Abb. 3: Valepotriathydrine: Valtratumhydrin- und Didrovaltratumhydrintypen



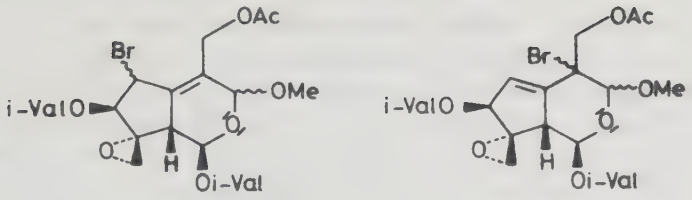
		R_1	R_2	R_3	R_4
Dientyp:					
Acetoxy-VH	(HÖLZL et al.,1976)	i-Val	i-Val	Ac	Ac
Valtratum-isovaleroxyhydrin	(THIES,1968)	i-Val	i-Val	Ac	i-V
Isovaleroxy-deacylace-VH	(HÖLZL et al.,1976)	i-Val	β-OH-i-Val	Ac	i-V
Monoen-Typ:					
Didrovaltratum-VH (Valechlorin)	(POPOV et al.,1974)	i-Val	i-Val	Ac	Cl

β-OH-i-Val = β-Hydroxyisovaleriansäure

Bereits früher bildete THIES (1968, 1973) zur Konfigurationsaufklärung der Valepotriate partialsynthetisch durch Umsetzung von Valtratum mit verschiedenen Säuren die entsprechenden Hydrinderivate. So bildete sich mit Jodwasserstoffsäure das Valtratumjodhydrin (Abb. 3: R_4 = J). Analog wurden Valtratumbromhydrin und -Rhodanohydrin dargestellt. Das Valtratumhydrohydrin (R_4 = H, Abb. 3) wurde durch Reduktion von Valtratumjodhydrin gebildet. Analog synthetisierte THIES auch von Isovaltratum, Acevaltratum und Didrovaltratum diverse Hydrine. Daneben gelang THIES (1973) die Reindarstellung von Desacetylvaltratum und von Desisovaleroxydidrovaltratum sowie dessen Jod- und Rhodanohydrine.

Durch Bromierung von Valtratum in methanolischer Lösung bildete THIES (1968) zwei Paare isomerer Methoxybromide (Abb. 4).

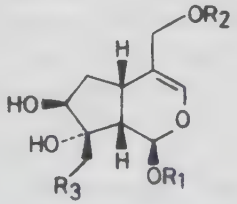
Abb. 4: Methoxybromide des Valtratums



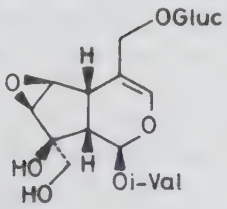
In gleicher Weise wurden auch die Methoxybromide von Acevaltratum und Didrovaltratum gebildet.

Neben den Estern sind bei den Valepotriaten auch noch Iridoidglykoside bekannt, die sich formal von den Valepotriathydrinen ableiten lassen. Wie bei den letzteren ist auch in den Valepotriatglykosiden der 8,10-Oxiranring nicht mehr vorhanden. Bemerkenswert ist beim Kanokosid A das Auftreten eines 6,7-Oxiranrings und die Konfigurationsänderung am C-8. Bisher wurden nur Glucoside aus der Monoen-Reihe gefunden (Abb. 5).

Abb. 5: Valepotriat-Glycoside



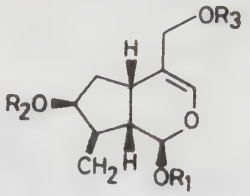
		R_1	R_2	R_3
Valerosidatum	(THIES,1970)	i-Val	Gluc	H
Patrinosid	(ENDO,TAGUCHI,1977)	H	Gluc	OH
Kanokosid B		i-Val	Gluc	OH



Kanokosid A (ENDO,TAGUCHI,1977)

Nicht mehr zu den Valepotriaten im engeren Sinne des Wortes gehören die von (THIES (1968) aus Valeriana wallichii DC. isolierten 8,10-Desoxido-Derivate (Abb. 6).

Abb. 6: 8,10-Desoxido-Derivate



		R_1	R_2	R_3
8,10-Desoxido-Didrovaltratum	(THIES et al.,1973)	i-Val	Ac	i-Val
8,10-Desoxido-Homodidrovaltratum	(THIES et al.,1981)	ß-Me-Val	Ac	i-Val

c. Stabilität

Allen Valepotriaten gemeinsam ist ihre relative Instabilität gegenüber Säuren, Laugen und höheren Temperaturen (THIES, 1967, 1969; MANNETSTÄTTER et al., 1967). Selbst im neutralen wäßrigen Milieu sind die Valepotriate relativ instabil. Nach FINK (1982) waren in einer wäßrigen Valtratum-Emulsion nach drei Tagen nur noch 55-58% der intakten Substanz nachweisbar. SCHILD (1969) fand in einer Baldriantinktur nach DAB 7, die mit 70% Ethanol hergestellt wurde, nach vier Wochen nur noch Spuren von Valtratum, aber in einer mit 96% Ethanol zubereiteten Tinktur noch 60% des ursprünglichen Valtratumgehalts. In lipophileren Lösungsmitteln wie Olivenöl und Propylenglykol zeigten die Valepotriate hingegen keine nennenswerten Abbauerscheinungen (SCHAETTE, 1971).
Auch bei der Trocknung einer frischen Wurzeldroge nimmt der Valepotriatgehalt bei Temperaturen über 40°C schnell ab (SCHILD, 1969).

2. Wirkungen der Valepotriate

Bei tierexperimentellen Untersuchungen zeigten die Valepotriate neben einer schwach analgetischen Wirksamkeit im Writhing-Test (v. EICKSTEDT und RAHMAN, 1969), einer spasmolytischen Wirksamkeit am isolierten Meerschweinchenileum (SCHAETTE, 1971) und einer muskelrelaxierenden sowie nicht näher erläuterten kardiovaskulären Wirkung (PETKOV, MANOLOV, 1976) vor allem zentral sedierende Eigenschaften. Die zentralen Effekte wurden mit einer ganzen Reihe verschiedener Untersuchungsmethoden nachgewiesen. Verwendet wurden, neben Verhaltensstudien und dem Drehstab, insbesondere verschiedene Methoden zur Testung der motorischen Aktivität. In jüngerer Zeit kamen noch Untersuchungen zur Beeinflussung des EEG hinzu.

V. EICKSTEDT und RAHMAN (1969) stellten bei ersten pharmakologischen Untersuchungen der peroral applizierten Valepotriate folgendes fest: Bei Verhaltensstudien an frei herumlaufenden Katzen eine Dämpfung von Unruhe, Angst und Aggressivität ohne Verminderung der Reaktivität und bei trainierten Mäusen am Drehstab eine Verbesserung des Koordinierungsvermögens. Weiterhin wiesen sie eine sedierende Wirksamkeit der Valepotriate durch Messung der Laufaktivität von Mäusen nach.
Der letzte Befund wurde von SCHAETTE (1971), JURCIC (1974), WILLEMS (1980), WAGNER et al. (1980) und FINK (1982) bestätigt. Die Ergebnisse der einzelnen Arbeiten sind allerdings wegen unterschiedlicher Motilitätsmeßmethoden nur schwer vergleichbar. Neben der Untersuchung unterschiedlicher Valepotriate als Gemisch oder als Reinsubstanzen und Verwendung verschiedener Hilfsstoffe für die diversen Applikationsarten unterscheiden sich die Arbeiten insbesondere in Bezug auf den Zeitpunkt und die Dauer der Testung. So führten WAGNER et al. (1980) die Untersuchungen jeweils morgens zur gleichen Zeit durch, hingegen verfolgte FINK (1982), die als einzige Einzeltiere statt Tiergruppen verwendete, die Motilitätsänderungen nach der Applikation um 18^{00}, über 24 Stunden. Bei den übrigen genannten Arbeiten fehlen diese Zeitangaben.

Beim Vergleich der Effektivität verschiedener Dosierungen auf die Motilität fällt auf, daß mit zunehmender Wirkstoffmenge nicht in jedem Fall eine Motilitätsabnahme zu verzeichnen war. JURCIC (1974) stellte zwei Stunden nach peroraler Applikation eines lipophilen Valmane®[x)] Extrakts an Mäusen im Dosisbereich von 1 und 10 mg eine Hypomotilität, aber bei höheren Dosen (100 und 1000 mg/kg) eine Hypermotilität fest. Auch FINK (1982) beobachtete bei steigenden Dosen von Valtratum (1 - 64 mg/kg Maus) besonders in den ersten Stunden nach peroraler Applikation - allerdings nur in wäßriger Emulsion und nicht in öliger Lösung - eine dosisabhängige Motilitätssteigerung. Hingegen registrierten WAGNER et al. (1980) für Valtratum und Didrovaltratum bei Dosen von jeweils 0,1, 1 und 10 mg/kg zwei Stunden nach peroraler Applikation dosisabhängige Hemmungen der Motilität. Didrovaltratum wirkte etwas stärker sedierend, wobei der Unterschied zum Valtratum aber nicht sehr groß war. Zu einem gegensätzlichen Ergebnis führte wiederum die Arbeit von FINK (1982). Für Didrovaltratum zeigte sich hier erst in höheren Dosen als bei Valtratum nach peroraler Gabe in öliger Lösung zumindest die Tendenz einer Dosisabhängigkeit. Bei peroraler Applikation konnten unter Berücksichtigung der verschiedenen Hilfsstoffe und eines bestimmten mittleren Wirkungsquotienten nach zehn Stunden auch für die ölige Valtratumlösung eine angedeutete Dosisabhängigkeit der Motilitätshemmung nachgewiesen werden (FINK, 1982). Bei steigenden i.v. Dosen von Valtratum (0,1 - 16 mg/kg) konnte aber keine eindeutige Dosisabhängigkeit der Motilitätshemmung ermittelt werden (FINK, 1982).

An freibeweglichen Katzen mit implantierten Elektroden untersuchten HOLM et al. (1980) in einer neurophysiologischen Arbeit die Wirkungen und zerebralen Angriffsorte eines peroral applizierten Valtratum-Isovaltratum Gemischs. Dabei wurden keine Änderungen des Spontanverhaltens sowie nur spärliche Abweichungen des EEG festgestellt. Hingegen zeigten sich signifikante Änderungen nach elektrischer Reizung verschiedener

---

x) Valmane® Dragees: Didrovaltratum 80%, Valtratum 15%, Acevaltratum 5%; Kali-Chemie AG, Hannover

Hirngebiete und akustischer Reizung mit Tönen von 3000 Hz. Auch der Muskeltonus war reduziert. Da keine Vigilanzabnahme zu beobachten war, hält Holm eine Sedation für unwahrscheinlich. Dies muß kein Widerspruch zu den bereits früher festgestellten Motilitätshemmungen sein, da auch die von HOLM et al. (1980) festgestellte Tranquillisierung ohne Müdigkeit die allgemeine Motilität herabsetzen kann. Im Gegensatz zur Neurophysiologie wird in der Pharmakologie nach HOLM et al. (1980) allein schon die Abnahme der motorischen Aktivität gewöhnlich einem sedativen Effekt der gegebenen Substanz gleichgesetzt, auch wenn das Versuchstier dabei keine Vigilanzabnahme zeigt. Aufgrund "limbischer Effekte" ordnen HOLM et al. (1980) die Valepotriate in ihren Wirkungen am ehesten den Thymoleptika zu.

Im Unterschied zu Holm untersuchte FINK (1982) die Beeinflussung des EEG durch Valtratum nicht im Ganztierversuch sondern am isoliert perfundierten Rattenhirn, um das Wirkungsprofil der nicht metabolisierten Substanz zu erfassen. Bei der Auswertung der EEG-Veränderungen könnte nach Fink auf einen vigilanzmindernden Effekt geschlossen werden. Die Frequenzveränderungen hielten allerdings den Anforderungen einer interferenzstatistischen Betrachtung nicht stand. Eine Dosisabhängigkeit ließ sich nicht nachweisen. So bewirkte die sehr niedrige Dosis von 0,1 µM/l die qualitativ gleichen EEG-Veränderungen wie ein bis drei Zehnerpotenzen höhere Valtratumkonzentrationen; die quantitativen EEG-Veränderungen waren jedoch nur geringfügig.

Mit der Pharmakokinetik der Valepotriate befaßten sich bereits einige Autoren. THIES (1971) prüfte den in vitro-Abbau von Didrovaltratum bei pH 5,6 mit menschlichem Duodenalsaft, wobei ein farbloser Dialdehyd gebildet wurde. Eingehender beschäftigten sich WAGNER und JURCIC (1980) mit dem Metabolismus von Didrovaltratum. Diese stellten dazu ^{14}C-Didrovaltratum her, indem die der Wurzel von Valeriana wallichii DC. ^{14}C-Acetat als Precursor anboten. Durch Radiogaschromatographie wurde ermittelt, daß jeweils 40% der ^{14}C-Aktivität im Essigsäurerest und im Isovaleriansäurerest aber nur 20% im Iridoid-Grundkörper enthalten waren. Bei in vitro-Studien mit Plasma

und Leber-Homogenaten von Mäusen zeigte sich durch Autoradiogramme von dc-Trennungen, daß ^{14}C-Didrovaltratum innerhalb weniger Stunden abgebaut wird, wobei aber keine genaueren Angaben über die entstandenen radioaktiv markierten Metabolite gemacht wurden.

Die Instabilität der Valepotriate wurde auch durch in vivo Metabolismusprüfungen bestätigt. Bei ersten Prüfungen an der Maus wies SCHAETTE (1971) drei Stunden nach peroraler Applikation eines Valepotriatextraktes zwar im Magen noch unveränderte Valepotriate nach, fand aber im Dünndarm nur noch Sekundärprodukte wie Baldrinal. Auch WAGNER und JURCIC (1980) stellten nach peroraler Applikation von ^{14}C-Didrovaltratum bei Mäusen fest, daß dieses bereits im Magen und Darm zu einem großen Teil abgebaut wird. Infolge dessen konnte nur noch wenig intakte Substanz in den einzelnen Organen, wie Leber, Lunge und Niere nachgewiesen werden. Aufgrund der Lipophilie der Valepotriate konnte ^{14}C-Didrovaltratum aber auch im Gehirn nachgewiesen werden. Dagegen fand sich die Hauptmenge an ^{14}C in den verschiedenen Organen in Form von Metabolisierungsprodukten. Als Hauptabbauprodukte wurde aufgrund von DC-Untersuchungen ein hydrophiles Iridoid-Polymerprodukt festgestellt, aber auch lipophile Abbauprodukte wie Baldrinalderivate oder 2,9-Dioxatricyclodecan wurden diskutiert.

Im Rahmen von Untersuchungen über die Ausscheidung stellte JURCIC (1974) in einer früheren Arbeit bereits innerhalb einer Stunde nach peroraler Gabe von ^{14}C-Didrovaltratum bei Mäusen ^{14}C als CO_2 in der Atemluft fest, welches für eine rasche Metabolisierung spricht. Innerhalb von sieben Stunden war die ausgeschiedene ^{14}C-Aktivität im Urin mit 0,63% größer als die im CO_2 mit 0,39% und in den Faeces mit 0,35% der applizierten Gesamtaktivität. Im Gegensatz dazu überwiegt bei der Ausscheidung von ^{14}C-Valtratum ebenfalls sieben Stunden nach peroraler Gabe bei Mäusen der faekale Anteil des renalen im Verhältnis 2:1 (FINK, 1982). Ähnlich wie auch bei Didrovaltratum war nach peroraler Applikation von ^{14}C-Valtratum bei Mäusen innerhalb der ersten drei Stunden eine relativ hohe Ausscheidung von $^{14}CO_2$ in der Atemluft festzustellen (FINK, 1982). Besonders hoch war diese Ausscheidung nach in-

travenöser Gabe mit 9% der applizierten Gesamtaktivität, so daß auf eine rasche Esterspaltung und Metabolisierung des Acetatrestes geschlossen werden kann. Im wesentlichen stimmen die Ergebnisse der von FINK (1982) mit einem genuinen Isomerengemisch der ^{14}C-Valtrate von Valeriana officinalis L. durchgeführten pharmakokinetischen Prüfungen mit denen des ^{14}C-Didrovaltratums überein. Über die Strukturen der aus den einzelnen Organen isolierten und nach DC-Trennung durch Autoradiogramm detektierten Metabolite sowie der ausgeschiedenen Metabolite werden auch von FINK (1982) keine genaueren Angaben gemacht. ^{14}C-Metabolite kommen aber ebenso als eigentliche Wirkform in Frage wie die genuinen Valepotriate selbst. Denn, wie auch schon WAGNER und JURCIC (1980) beim Didrovaltratum feststellten, konnte FINK (1982) intaktes Valtratum neben ^{14}C-Metaboliten im Gehirn der untersuchten Mäuse feststellen. Als wichtigster Resorptionsort der Valepotriate wird von FINK (1982) der Magen in Erwägung gezogen, da in der Magenwand ein hoher Anteil der ^{14}C-Radioaktivität gefunden wurde.

Über den Wirkungsmechanismus und den Angriffsort der Valepotriate ist, abgesehen von den Untersuchungen von HOLM et al. (1980), nur wenig bekannt. EICKSTEDT (1969) stellte für Valtratum bei peroraler Applikation an Mäusen eine Schlafverkürzung der Alkoholnarkose fest. PETKOV und MANOLOV (1976) beobachteten bei Mäusen eine Verminderung der exzitatorischen Effekte von Morphin und Amphetamin durch einen Valepotriatextrakt, während die Hexobarbitalnarkose verlängert wurde. Dagegen konnte FINK (1982) bei Mäusen eine Schlafzeitverkürzung der Hexobarbitalnarkose durch Valtratum und Didrovaltratum nachweisen. Nach VILLATORO (1979) zielt das Wirkungsspektrum der Valepotriate auf das vegetative Nervensystem und die in der Formatio retikularis liegenden Regulationszentren, allerdings lassen sich solche "Wirkungsspektren" wohl pharmakologisch kaum halten.

Die mittlere letale Dosis einiger Valepotriate wurde von v. EICKSTEDT und RAHMAN (1969) an Mäusen untersucht. Bei intraperitonealer Gabe betrug die LD_{50} für Valtratum, Didrovaltratum und Acevaltratum 64, 125 resp. 150 mg/kg. Die mittlere

therapeutische Dosis von Valmane® beträgt beim Menschen zum Vergleich 300 mg pro Tag.

Wie die Tierversuche zeigten, konnten die aus pharmakologischer Sicht zu fordernden dosisabhängigen Effekte der Valepotriate oft nicht eindeutig bestätigt werden. Entsprechende Unterschiede finden sich auch bei den Ergebnissen der klinischen Prüfungen. Während BOETHERS (1969) bei stationär behandelten Patienten durch eine Dosissteigerung von Valmane® in der Regel keine weitere Verstärkung der "vegetativ dämpfenden Wirkung" feststellte, ergab ein Doppelblindversuch von MAYER und SPRINGER (1974) mit dem gleichen Fertigarzneimittel eine dosisabhängige Steigerung der konzentrativen Leistungsfähigkeit. Weiter stellten MAYER und SPRINGER (1974) fest, daß im Kombinationsversuch mit Alkohol die erwartete qualitative Leistungsminderung ausblieb. Die alkoholbedingte Minderung der Kritikfähigkeit konnte durch Valtratum nicht ausgehoben werden. Signifikante Nebenwirkungen der Valepotriate konnten nicht gefunden werden (BOETHERS, 1969). Die gute Verträglichkeit valepotriathaltiger Arzneimittel ist nach BRAUN et al. (1982) offensichtlich auf die orale Applikationsweise zurückzuführen. Die Autoren diskutieren als Ursache dafür zum einen eine schlechte Resorption und zum anderen einen schnellen Abbau, wobei auch ein hoher first-pass-Effekt in Erwägung gezogen werden muß. In vitro erwiesen sich Valepotriate mit Epoxidstruktur als beachtliche Alkylanzien gegenüber Karzinomzellen (BOUNTHANH et al. 1981; BRAUN et al. 1982), wobei diese Wirkung mit dem Vorliegen der Epoxi-Gruppierung in Zusammenhang gebracht wurde.

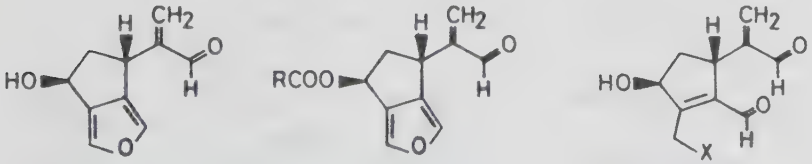
3. Chemie und Wirkungen der Abbauprodukte der Valepotriate

a. Chemie der Abbauprodukte

Aufgrund der schon vorher beschriebenen Instabilität der Valepotriate sind Sekundärprodukte bereits seit der Entdeckung dieser Naturstoffe bekannt. So erkannten schon MANNETSTÄTTER et al. (1966), daß die gelben Verbindungen eines ethanolischen Wurzelextrakts von Centranthus ruber DC. nicht genuin vorkommen. Das gelbe Hauptabbauprodukt wurde von THIES (1966) als Baldrinal bezeichnet.

Zur analytischen Unterscheidung der Monoen- und Dien-Valepotriate untersuchte THIES (1969) den Abbau durch Säuren. Monoen-Valepotriate werden durch Säuren wie z.B. Trichloressigsäure zu schwach bräunlichen Verbindungen abgebaut. Dabei handelt es sich um zwei Cyclopenta(c)furane und um einen Dialdehyd, die durch Hydrolyse der Estergruppen und anschließende Dehydratisierung entstehen (Abb. 7).

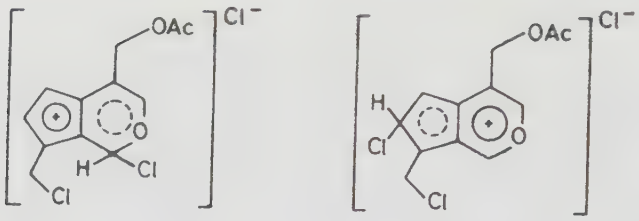
Abb. 7: Monoen-Valepotriat-Abbauprodukte nach THIES (1969)



R = CH_3 oder andere Alkyle X = Halogen oder OCO-Alkyl

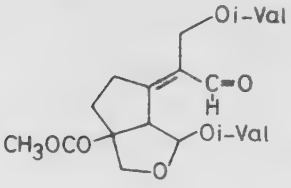
Aus den Dien-Valepotriaten entstehen sowohl die in Lösung blaugefärbten Cyclopenta(c)pyrylium Salze (Abb. 8) als auch die gelbgefärbten Baldrinale mit einem Cyclopenta(c)pyran Gerüst.

Abb. 8: Cyclopenta(c)pyrylium-Salze aus Valtratum

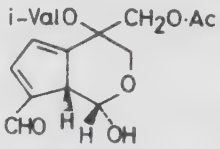


Analog der Bildung von Baldrinal aus Valtratum bildet sich Homobaldrinal beim Abbau mit Trichloressigsäure aus Isovaltratum (THIES, 1967). Dagegen entsteht bei der Umsetzung mit Aluminiumoxid in Hexan aus Isovaltratum als weiteres Abbauprodukt Isovaltral (DENEE et al., 1979) (Abb. 8). Durch Behandlung eines Methylenchloridextraktes aus Wurzeln von Centranthus ruber DC. mit Trichloressigsäure bildet sich neben Baldrinal aus Valtratum auch Valtroxal. Als gemeinsames Abbauprodukt von Baldrinal und Valtroxal wurde noch Desacylbaldrinal nachgewiesen. Daneben wurde die Bildung von Baldrinal aus Valtroxal beschrieben (SCHNEIDER und WILLEMS, 1982) (Abb. 9).

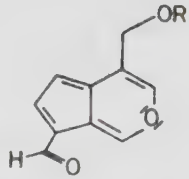
Abb. 9: Baldrinale, Valtroxal und Isovaltral



Isovaltral
(DENEE et al., 1979)



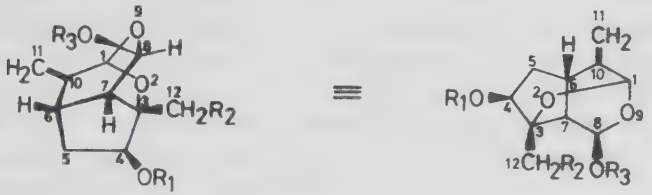
Valtroxal
(SCHNEIDER und WILLEMS, 1979)



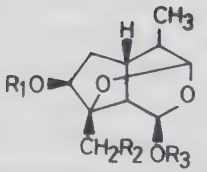
Baldrinal R=Ac
(THIES, 1966)
Homobaldrinal R=i-Val
(THIES, 1967)
Desacylbaldrinal R=H
(SCHNEIDER und WILLEMS, 1979)

Im Gegensatz zu den durch Hydrolysen und Eliminierungsreaktionen gebildeten Baldrinalen entsteht eine weitere Gruppe von Sekundärprodukten durch säurekatalysierte Alkoholyse von Didrovaltratum bzw. Valerosidatum. Dabei erhielt THIES (1970, 1974) verschiedene 2,9-Dioxatricyclo(4,3,1,$O^{3,7}$)decane (Formel A), von denen einige noch reduziert (Formel B) oder zu Ketonen oxidiert (Formel C) wurden (Abb. 10).

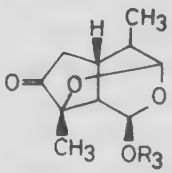
Abb. 10: Allgemeine Formeln der 2,9-Dioxatricyclodecane



Formel A ≡ Formel A



Formel B



Formel C

In schlecht gelagerter Droge fand THIES (1968) außerdem die formal durch Anlagerung von Wasser an den Epoxidring gebildeten Glycole von Valtratum, Didrovaltratum und Desacetyldidrovaltratum.

b. Wirkungen der Abbauprodukte

Aufgrund der raschen Valepotriat-Zersetzung im sauren und alkalischen Milieu lag es nahe, auch die Wirkung der Abbauprodukte genauer zu untersuchen. JURCIC (1974) registrierte nach peroraler und intravenöser Gabe einer durch Alkali-Abbau von Valmane® hergestellten, chemisch nicht näher charakterisierten Substanz eine starke Hemmung der Spontanmotilität von Mäusen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, bewirkt Homobaldrinal nach peroraler Applikation bei Mäusen eine stärkere Motilitätshemmung als Valtratum und Didrovaltratum (WAGNER et al., 1980). Daneben zeigten die Alkali- und Duodenalsaftabbauprodukte von Didrovaltratum eine schwächer sedierende Wirkung in Relation zur genuinen Substanz. Bemerkenswerterweise wurde bei einer Dosissteigerung des Alkali-Abbauproduktes von 10 auf 100 mg/kg keine Wirkungssteigerung, sondern eine Wirkungsabnahme beobachtet.

In einer Patentschrift wurde von THIES (1974) bei einem 2,9-Dioxatricyclodecan eine sedierende Wirkung beschrieben. Auch Baldrinal, Desacylbaldrinal und Valtroxal zeigten nach intraperitonealer Applikation eine Hemmung der Spontanmotilität bei Mäusen (WILLEMS, 1980). Dabei waren für Baldrinal und Desacylbaldrinal jeweils etwa die gleichen Wirkungen wie bei Valmane zu beobachten. Die Dosierungen betrugen jeweils 80 mg/kg. Valtroxal bewirkte bei 20 mg/kg eine stärkere Motilitätshemmung als Valmane. Peroral zeigte Valtroxal bei einer Dosis von 50 mg/kg Maus keine Hemmung der Motilität. Im Rahmen der Untersuchungen über die Beeinflussung der Hexabarbitalnarkose durch FINK (1982) zeigten sich nach peroraler Applikation eines als Abbauprodukt zu wertenden Polyhydroxyalkohols antagonistische Effekte.

Obwohl Baldrinal die Epoxidgruppe nicht mehr enthält, besitzt auch diese Verbindung cytotoxische Eigenschaften gegenüber Karzinomzellen in vitro. Diese sind allerdings schwächer als bei dem zum Vergleich getesteten Valtratum (BOUNTHANH et al., 1981).

III. SPEZIELLER TEIL

1. Isolierung der Valepotriate

a. Auswahl der Ausgangsdroge

Wie schon in der Einführung erwähnt, sollte im Rahmen dieser Arbeit das Abbauverhalten von Valepotriaten unter dem Einfluß von Wärme genauer untersucht werden. Zur Erzielung einer möglichst großen Ausbeute an Abbauprodukten wurde statt der offizinellen Art Valeriana officinalis L. mit etwa 1% Gesamtvalepotriaten, Centranthus ruber DC. verwendet, in deren Wurzel nach HÖLZL (1975) über 3% Valepotriate - davon etwa 90% Valtratum - enthalten sind.

b. Extraktion der Valepotriate

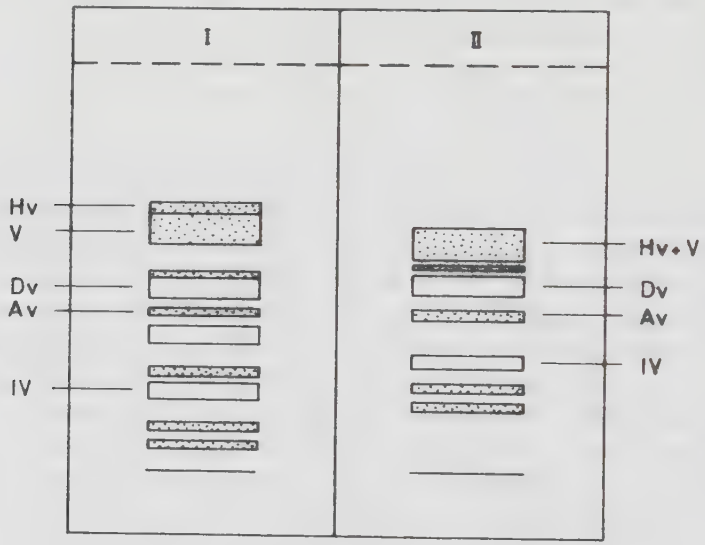
Bei den verschiedenen in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Extraktion von Valepotriaten (THIES, 1968; MANNET-STÄTTER et al., 1967; SCHILD, 1969) werden unterschiedliche Lösungsmittel, zum Teil auch mit Säurezusatz, verwendet. Am schonendsten scheint dabei die Methode nach Schild zu sein, der mit Dichlormethan eine nahezu quantitative Extraktion der Droge erreichte. In diesem Lösungsmittel sind auch aufgrund der hohen Lipophilie die geringsten Zersetzungen zu erwarten. Daher wurden die getrockneten und grob pulverisierten Wurzeln in Abänderung des Verfahrens nach Schild mehrfach mit Dichlormethan durch einen Ultraturrax extrahiert und die vereinigten Extrakte im Vakuum eingeengt (vgl. Exp. Teil 3.b, S. 91).

c. Dünnschichtchromatographische Trennung der Valepotriate

Zur DC-Auftrennung der Valepotriate und ihrer Abbauprodukte wurden Kieselgel HF_{254} Platten verwendet. Neben den in der Literatur beschriebenen Fließmitteln Hexan-Butanon-(2) (80/20) (STAHL, SCHILD, 1969) und Toluol-Ethylacetat (83/17) (JURCIC, 1974) eignen sich auch die Fließmittel Toluol-Ethanol (80/20)

und Ether-Petrolether (85/15) insbesondere bei mehrfacher Entwicklung. In Abbildung 11 ist die DC-Trennung der Valepotriate des Centranthus ruber-Extrakts in zwei Fließmitteln schematisch wiedergegeben. Die Trennung von Valtratum und Homovaltratum gelang am besten mit Toluol-Ethylacetat. Neben dem Hauptinhaltsstoff Valtratum sind in dem Extrakt Homovaltratum, Didrovaltratum, Acevaltratum und IVHD-Valtratum sowie einige andere nicht identifizierbare Verbindungen enthalten.

Abb. 11: Dünnschichtchromatogramm der Valepotriate aus der Wurzel von Centranthus ruber DC. (CH_2Cl_2-Extrakt)



Hv Homovaltratum
V Valtratum
Dv Didrovaltratum
Av Acevaltratum
IV IVHD-Valtratum

Fließmittel: I Toluol-Ethylacetat (83/17)
II Hexan-Butanon-(2) (80/20)

Detektion : 1. UV 254 nm
2. DNPH-Eisessig-Salzsäure oder NBP-Triethylamin-Aceton

sichtbar im kurzwelligen UV (254 nm)

d. DC-Nachweis der Valepotriate

Auf der unbesprühten Platten lassen sich, wie bereits erwähnt, die Dien-Valepotriate aufgrund ihrer Fluoreszenzminderung im kurzwelligen UV erkennen. Die Monoen-Valepotriate sind erst nach Behandlung mit Sprühreagenzien sichtbar. Die in der Literatur beschriebenen Sprühreagenzien unterscheiden sich in Selektivität und Toxizität. Das Benzidin-Trichloressigsäure Reagenz (THIES, 1969) wurde aufgrund seiner Cancerogenität nicht verwendet und statt dessen 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Eisessig-Salzsäure (DNPH) nach STAHL und SCHILD (1969) benützt. Mit letzterem bilden die Dien-Valepotriate bereits bei Raumtemperatur blaugrüne Farbstoffe. Monoen-Valepotriate wie Didro- und IVHD-Valtratum färben sich erst nach Erhitzen auf 120^{o} C ocker bzw. blau. Eine selektive Unterscheidung der Valepotriate von anderen Verbindungen ist mit 4-(p-Nitrobenzyl)-pyridin - Triethylamin - Aceton (NBP) (BRAUN et al., 1982) möglich, das nur beim Vorhandensein eines intakten Epoxidrings einen blauen Farbstoff bildet. Dien-Valepotriate erscheinen blauviolett und Monoen-Valepotriate blau gefärbt.

2. Isolierung und Identifizierung von K5 und von K6, einem neuen Produkt des Thermoabbaus von Valtratum

a. Extraktion

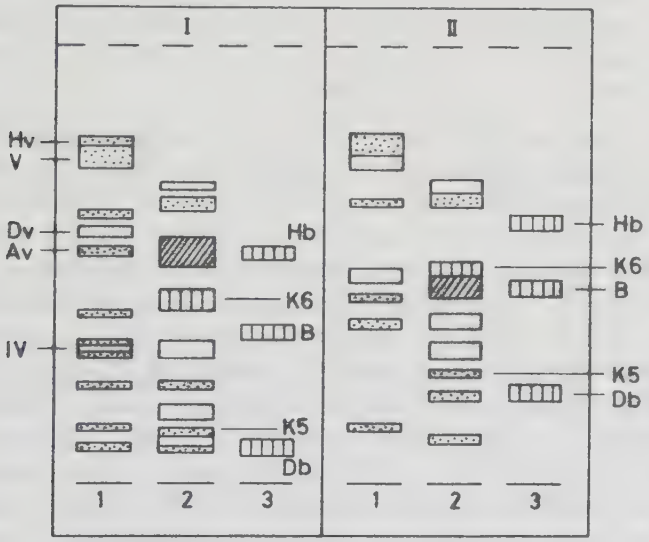
Als Ausgangsmaterial wurden die getrockneten und grob gepulverten Wurzeln von Centranthus ruber DC. verwendet. Das Drogenpulver wurde in Abänderung der Herstellungsvorschrift der Ph. Helv. V für Tinktura Valeriana mit Ethanol (96 Vol.%) im Soxhlet so lange extrahiert, bis im Extrakt dc keine Valepotriate mehr nachweisbar waren. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

b. Dünnschichtchromatographische Untersuchung des Ethanol-Extrakts

In Abbildung 12 ist die DC-Trennung des ethanolischen Soxhlet-Extrakts mit zwei verschiedenen Fließmitteln dargestellt. Zum Vergleich ist auch das Dünnschichtchromatogramm einer frisch durch Perkolation hergestellten Tinktur (DAB 8) der Droge dargestellt. Wie die Abbildung zeigt, entspricht die Valepotriatzusammensetzung der Tinktur derjenigen eines Methylenchloridextrakts (vgl. Abb. 11). Dagegen sind im Soxhlet-Extrakt genuine Valepotriate nicht mehr vorhanden. Neben einer roten Bande fällt auf der unbesprühten Platte besonders eine gelbe Bande auf. Nach Besprühen mit den Reagenzien DNPH und NBP färbt sich diese gelbe Bande rot bzw. bleibt gelb. Aufgrund ihrer Färbung und ihrer Reaktion mit DNPH wurde zuerst vermutet, daß es sich um ein Baldrinal-Derivat handeln könnte. Wie die DC zeigt, ist die Substanz aber nicht identisch mit Desacylbaldrinal, Baldrinal oder Homobaldrinal. Daraufhin erhielt die Substanz die Laborbezeichnung K6.

Außerdem wurde für einen zweiten Stoff des Soxhlet-Extrakts die Existenz eines noch nicht beschriebenen Valepotriat-Abbauprodukts vermutet, da sich dieser mit DNPH-Sprühreagenz ocker färbte. Diese Substanz erhielt die Laborbezeichnung K5.

Abb. 12: Dünnschichtchromatogramm eines ethanolischen Soxhlet-Extrakts der Wurzel von Centranthus ruber DC. im Vergleich zu einer Tinktur und authentischen Baldrinal-Derivaten



Hv	Homovaltratum	IV	IVHD-Valtratum
V	Valtratum	Hb	Homobaldrinal
Dv	Didrovaltratum	B	Baldrinal
Av	Acevaltratum	Db	Desacylbaldrinal

1 Tinktur 2 Soxhlet-Extrakt 3 Vergleichssubstanzen

Fließmittel: I Toluol-Ethylacetat (83/17) 2 x entwickelt
II Ether-Petrolether (85/15)

Detektion : 1. UV 254 nm
2. DNPH-Eisessig-Salzsäure oder NBP-Triethylamin-Aceton

sichtbar im kurzwelligen UV (254 nm)

gelb

rot

e. Isolierung von K5 und K6

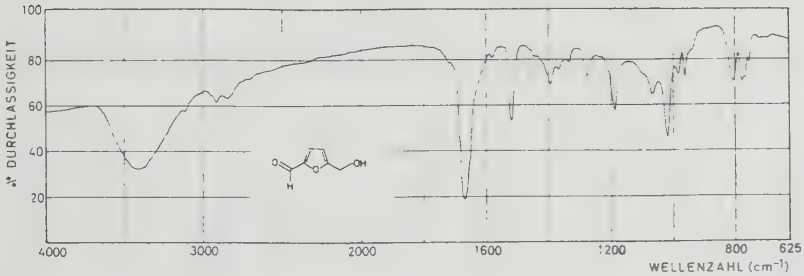
Aufgrund von DC-Voruntersuchungen mit verschiedenen Fließmitteln zur Auftrennungsoptimierung des Soxhlet-Extrakts wurde eine SC-Trennung an Kieselgel mit Ether-Petrolether (85/15) vorgenommen. Von den erhaltenen Fraktionen wurden diejenigen, die K5 bzw. K6 enthielten, vereinigt und im Vakuum eingeengt.

Kristallisationsversuche mit verschiedenen Lösungsmitteln wie z.B. Hexan-Butanon-(2) und Ether-Petrolether gelangen trotz längerer Aufbewahrung bei -18° C nicht. Daher wurde die Endreinigung von K5 und K6 mit präparativer DC an Kieselgelplatten durchgeführt. Als Fließmittel wurde zuerst Toluol-Ethanol (80/20) und danach Ethylacetat verwendet. Die verwendeten Platten wurden zur Optimierung der Trennung jeweils mehrfach entwickelt. Als Nachteil mußten bei dieser Methode erhebliche Ausbeuteverluste hingenommen werden, da sich die Verbindungen teilweise zersetzen. Die Instabilität gegen Luftsauerstoff zeigte sich durch Bildung verschiedener Nebenbanden sowie von braunen Polymerverbindungen, die am Start jeweils zurückblieben. Nach Elution der reinen Substanzen mit Ether aus dem von den Platten abgeschabten Kieselgel und Einengen unter Vakuum schieden sich im Verlauf mehrtägiger Lagerung bei -18° C hellgelbe (K5) bzw. gelbbraune (K6) Kristalle aus. Nach Umkristallisation mit Ether-Petrolether wurden Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 29-30° C (K5) bzw. 95-98° C (K6) erhalten (Ausbeute bezogen auf die getrocknete Ausgangsdroge: etwa 0,01% bzw. 0,005%).

f. Strukturaufklärung der Substanz K5

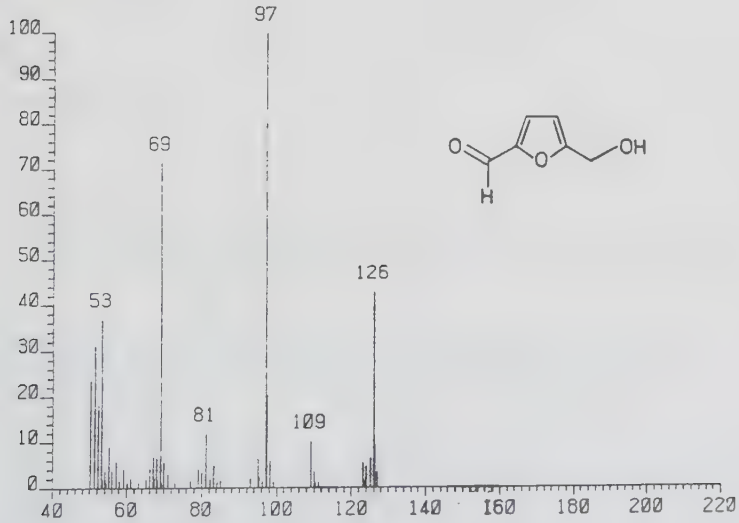
Bereits die Reaktion mit DNPH auf der DC-Platte führte zu der Vermutung, daß es sich bei K5 um einen Aldehyd handeln könnte. Diese Annahme wurde durch das IR-Spektrum (Abb. 13) erhärtet, da hier eine starke Bande bei 1670 cm^{-1} auf eine möglicherweise konjugierte Aldehydgruppe hinweist. Das IR-Spektrum gibt außerdem einen Hinweis auf eine Hydroxylfunktion, wofür die breite Bande bei 3420 cm^{-1} spricht.

Abb. 13: IR-Spektrum von K5 (= 5-Hydroxymethyl-furfural)



Das Massenspektrum der Substanz K5 (Abb. 14) zeigt einen höchsten Peak bei $M^{+\cdot}$, m/e = 126.

Abb. 14: Massenspektrum von K5 (= 5-Hydroxymethyl-furfural)



Zusammen mit den Werten der Elementaranalyse ergibt sich eine Summenformel von $C_6H_6O_3$ (Tab. 1).

Tab. 1: Physikochemische Daten von K5 (= 5-Hydroxymethylfurfural)

	K5	Lit.-Werte[1.]
Molekülpeak, M^+	126	
CH-Analyse[2.]	Gef.: C: 56,00; H: 5,05; O: 38,95 Ber.: C: 57,15; H: 4,80; O: 38,06	
Summenformel	$C_6H_6O_3$	$C_6H_6O_3$
UV-Spektrum λ_{max}	1) 225 nm; $\log\varepsilon = 3,41$ 2) 279 nm; $\log\varepsilon = 4,18$	
Schmelzpunkt	$29^\circ - 30^\circ$ C	$35^\circ - 36^\circ$ C

1. Römpp, Chemie Lexikon 7. Aufl. 1973
2. Die Sauerstoffwerte sind Differenzwerte; Abweichungen sind auf die noch ungenügende Reinheit durch Instabilität der nur in geringer Menge zur Verfügung stehender isolierter Substanz zurückzuführen.

Die sich aus der Elementarformel errechnenden vier Doppelbindungsäquivalente sprechen ebenso wie die Lage des Absorptionsmaximums im UV-Spektrum für das Vorliegen von konjugierten Doppelbindungen. Das Vorhandensein der beiden funktionellen Gruppen wird durch das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 15) bewiesen. So muß das Singulett bei 9,65 ppm einer Aldehydgruppe zugeschrieben werden, und das breite Singulett bei 3,40 ppm einer Hydroxygruppe. Das Vorliegen einer Hydroxygruppe wurde durch Deuteriumoxidaustausch bewiesen. Wie das in Abbildung 16 nach

Abb. 15: ^{1}H-NMR-Spektrum von K5 (= 5-Hydroxymethyl-furfural)

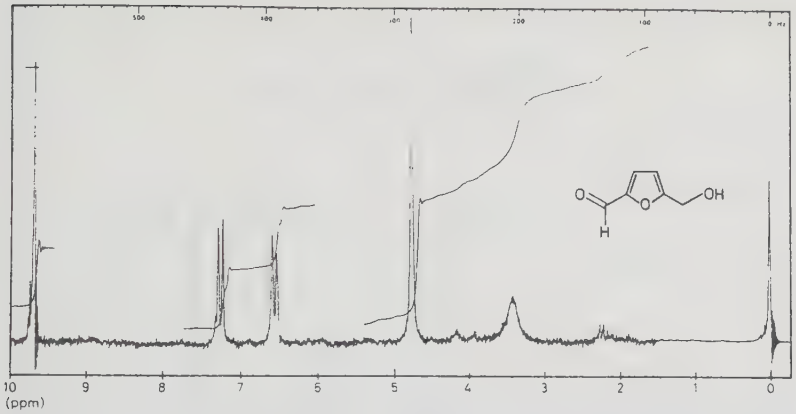
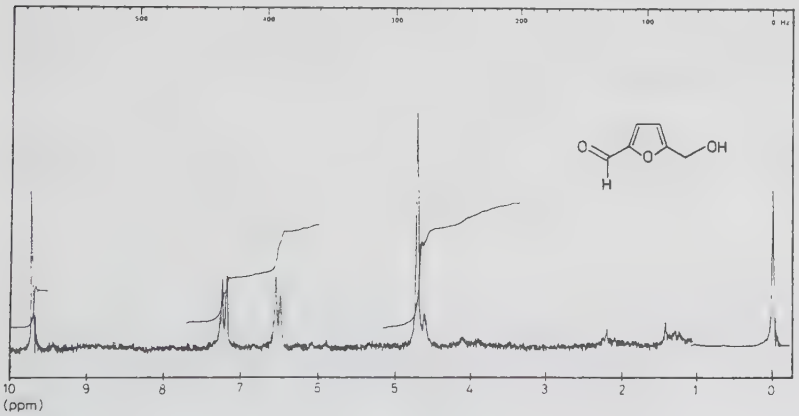
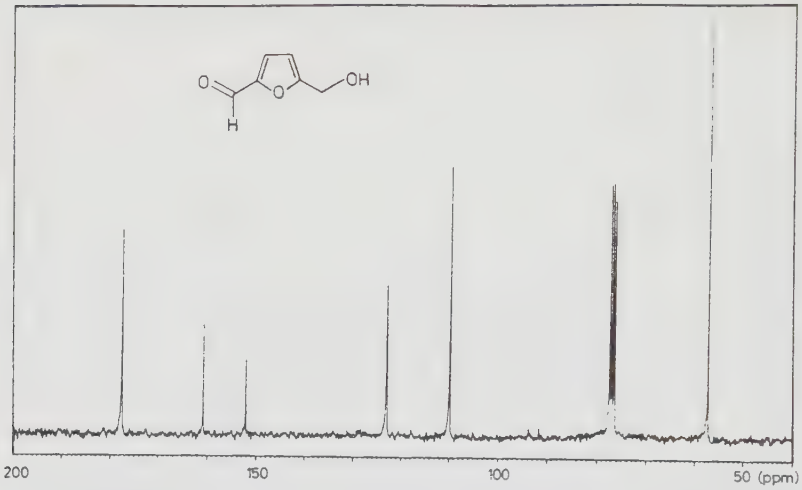


Abb. 16: ^{1}H-NMR-Spektrum von K5 (= 5-Hydroxymethyl-furfural) nach D_2O-Austausch



D_2O-Austausch aufgenommene Spektrum zeigt, ist das breite Singulett bei 3,40 ppm verschwunden. Zur vollständigen Strukturaufklärung von K5 wurde ein ^{13}C-NMR-Spektrum angefertigt (Abb. 17).

Abb. 17: ^{13}C-NMR-Spektrum von K5 (= 5-Hydroxymethyl-furfural)



Die Aldehydgruppe zeigt sich hier durch ein im off-resonance Spektrum als Dublett auftretendes Signal bei 177,7 ppm, und eine Hydroxymethylgruppe durch ein Triplett bei 57,4 ppm. Die Protonen dieser Methylengruppe zeigen sich im ^{1}H-NMR-Spektrum als ein breites Singulett bei 4,70 ppm (vgl. Tab. 2).

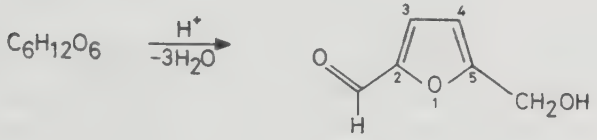
Tab. 2: Vergleich der ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Spektren von K5 (= 5-Hydroxymethyl-furfural; s.S. 31) mit Referenzsubstanz (Lsgm.: $CDCl_3$; Standard: TMS; Verschiebung in ppm, δ-Werte)

^{1}H-NMR	K_5	Ref.*	^{13}C-NMR	K5
			C-2	152,2 s
H-3	7,24 d	7,24 d	C-3	109,9 d
H-4	6,52 m	6,53 m	C-4	123,0 d
			C-5	160,9 s
-CHO an C-2	9,65 s	9,59 s	-CHO an C-2	177,7 d
$-CH_2$ an C-5	4,70 bs	4,72 d	$-CH_2$ an C-5	57,4 t
-OH an CH_2	3,40 bs	2,23 bs		

*Fa. Roth, Karlsruhe

Aus dem ^{13}C-NMR-Spektrum ergibt sich zusammen mit den anderen Daten für K5 die in Abbildung 18 wiedergegebene Strukturformel.

Abb. 18: K5 (= 5-Hydroxymethyl-furfural)



Wie die Abbildung 18 zeigt, handelt es sich bei K5 um 5-Hydroxymethyl-furfural. Dieses entsteht nach BEYER und WALTER (1981) bei der Einwirkung stark verdünnter Säuren auf Hexosen besonders Ketohexosen, wie Fruktose, wobei der Mechanismus nicht völlig geklärt ist. Zur Identitätskontrolle durchgeführte vergleichende Untersuchungen wie ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, IR und DC mit verschiedenen Fließmitteln ergaben nahezu volle Übereinstimmung mit der Referenzsubstanz (vgl. Tab. 1 + 2). Da es sich bei K5 um kein Valepotriatabbauprodukt handelt, wurde dieses nur noch zu Vergleichszwecken in die Untersuchungen mit einbezogen.

g. Strukturaufklärung von K6

Bereits die gelbe Farbe von K6 und die Bildung einer rot gefärbten DC-Bande beim Ansprühen mit DNPH-Reagens weist auf eine strukturelle Verwandtschaft zu den Baldrinalen hin. Dies wird sowohl durch das im Vergleich zu anderen Baldrinalen fast identische UV-Spektrum (Tab. 3) als auch durch das ähnliche IR-Spektrum bestätigt (Abb. 19). Die größte Übereinstimmung war mit dem IR-Spektrum von Desacylbaldrinal (WILLEMS, 1980) festzustellen. Das IR-Spektrum von K6 zeigt aufgrund der starken Bande bei 1640 cm^{-1} eine α,β-ungesättigte Aldehydgruppe an. Das Vorliegen einer Aldehydgruppe wird dadurch bewiesen, daß im IR-Spektrum des entsprechenden 2,4-Di-

Tab. 3: Physikochemische Daten von K6 im Vergleich zu Desacylbaldrinal und Baldrinal

	K6	Desacylbaldrinal[1.]	Baldrinal[2.]
Molekülpeak, M^+	204	176	218
Summenformel	$C_{12}H_{12}O_3$	$C_{10}H_8O_3$	$C_{12}H_{10}O_4$
UV-Spektrum 1.	228 nm;logε=3,89	228 nm;logε=4,02	227 nm;logε=4,19
λ_{max} 2.	244 nm;logε=3,93	240 nm;logε=3,99	244 nm;logε=4,17
3.	283 nm;logε=3,90	287 nm;logε=3,95	287 nm;logε=4,08
VIS 4.	427 nm;logε=3,42	428 nm;logε=3,66	425 nm;logε=3,86
Schmelzpunkt	95° - 98° C	115° - 117° C	112° - 113° C
Schmelzpunkt des 2,4-DNPH	216°-218° C	>350° C	235° - 236° C

1. WILLEMS, 1980 2. THIES, 1968

Abb. 19: IR-Spektrum von K6

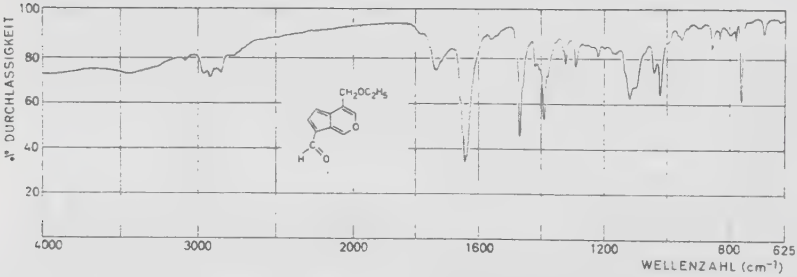
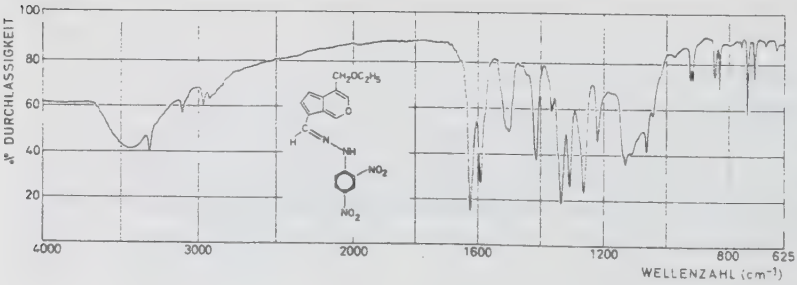


Abb. 20: IR-Spektrum des 2,4-Dinitrophenylhydrazons von K6



nitrophenylhydrazons (Abb. 20) die Aldehydbande nicht mehr auftritt.

Das Massenspektrum von K6 zeigt einen höchsten Peak bei $M^{+\cdot}$, m/e = 204 (Abb. 21). Daß es sich hier um den Molekularpeak handelt, bestätigt das Massenspektrum des 2,4-DNPH mit dem der Berechnung entsprechenden Molekularpeak bei $M^{+\cdot}$, m/e = 384 (Abb. 22).

Abb. 21: Massenspektrum von K6

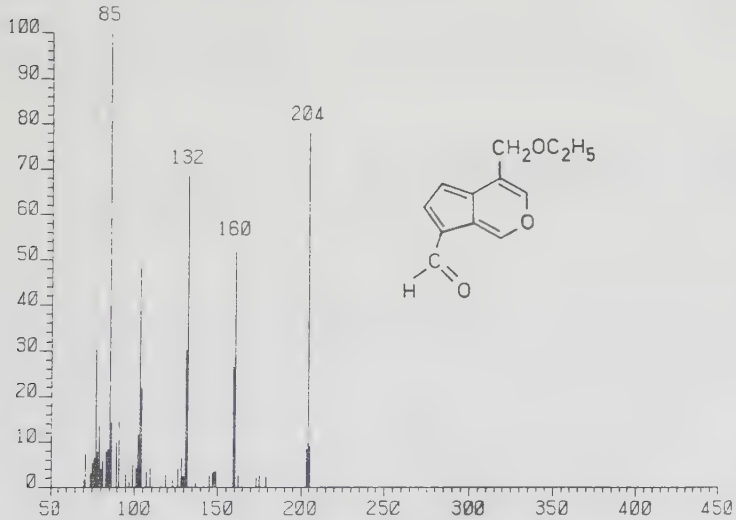
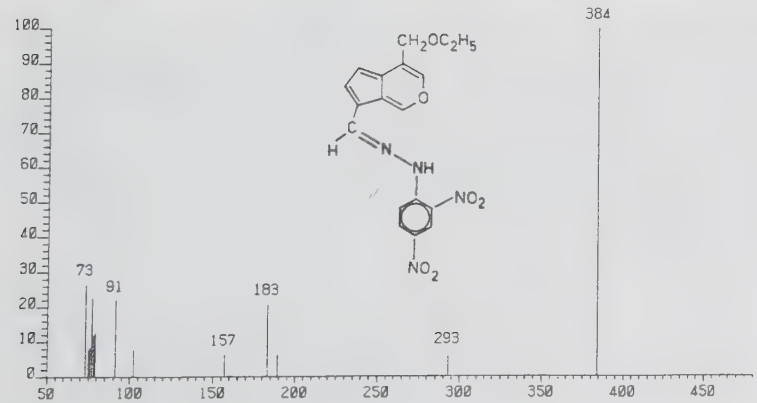
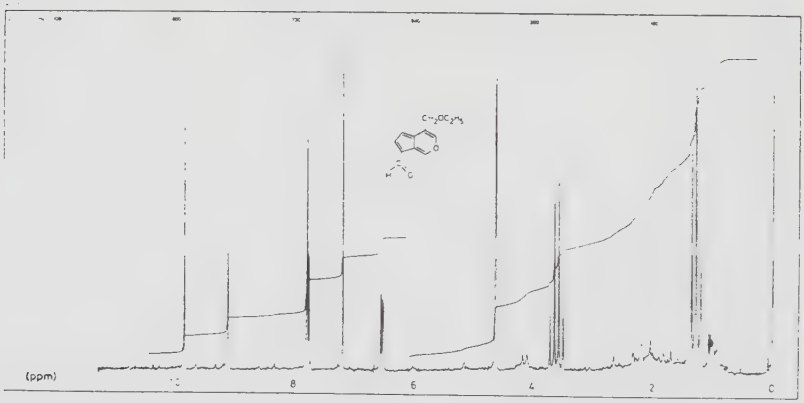


Abb. 22: Massenspektrum des 2,4-Dinitrophenylhydrazons von K6



Daraufhin wurde als Struktur für K6 ein Ethylether des Desacylbaldrinals vermutet. Ein aufgrund der gleichen Massendifferenz zum Desacylbaldrinal von 28 ebenfalls in Frage kommender Formylester des Desacylbaldrinals konnte ausgeschlossen werden, da im IR-Spektrum des K6 eine Ester-Bande nicht auftritt. Wie ein Vergleich mit dem IR-Spektrum des Baldrinals zeigte, ist nur bei diesem eine starke Esterbande bei 1725 cm^{-1} zu beobachten. Die Strukturvorstellung eines Ethylethers des Desacylbaldrinals wird durch das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 23) bestätigt. Hier treten im höheren Feld die für eine Ethylgruppe typischen Signale auf. Der Methylengruppe entspricht das Quartett bei 3,64 ppm und den Protonen der Methylgruppe das Triplett bei 1,28 ppm.

Abb. 23: ^{1}H-NMR-Spektrum von K6



Da sich die Signale der Protonen an C-3 und C-7 teilweise überlappen, erscheint das Duplett von H-7 in Abbildung 23 nur als Singulett. Im übrigen entspricht das ^{1}H-NMR-Spektrum von K6 fast dem des Desacylbaldrinals (Tab. 4) und bestätigt damit auch das identische Grundgerüst. Ein D_2O-Austausch ergab keinen Hinweis auf eine Hydroxygruppe, wie etwa beim Desacylbaldrinal.

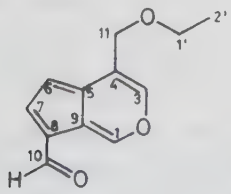
Tab. 4: ^{1}H-NMR-Daten von K6 im Vergleich zu Desacylbaldrinal und Baldrinal (Lsgm.: $CDCl_3$; Standard TMS; Verschiebung in ppm, δ-Werte)

	K6	Desacylbaldrinal*	Baldrinal*
H-1	9,20 s	9,16 s	9,19 s
H-3	7,87 s	7,91 s	7,89 s
H-6	6,60 dd	6,61 d	6,63 d
H-7	7,83 d	7,86 d	7,85 d
H-10	9,93 s	9,90 s	9,94 s
H-11	4,68 s	4,91 s	5,26 s
H-1'	3,64 q		
H-2'	1,28 t		
H-13			2,12 s

*WILLEMS, 1980

Aufgrund der verschiedenen Spektren der Substanz und ihres 2,4-Dinitrophenylhydrazons kommt K6 die in Abbildung 24 wiedergegebene Struktur zu.

Abb. 24: K6 = Ethylether des Desacylbaldrinal



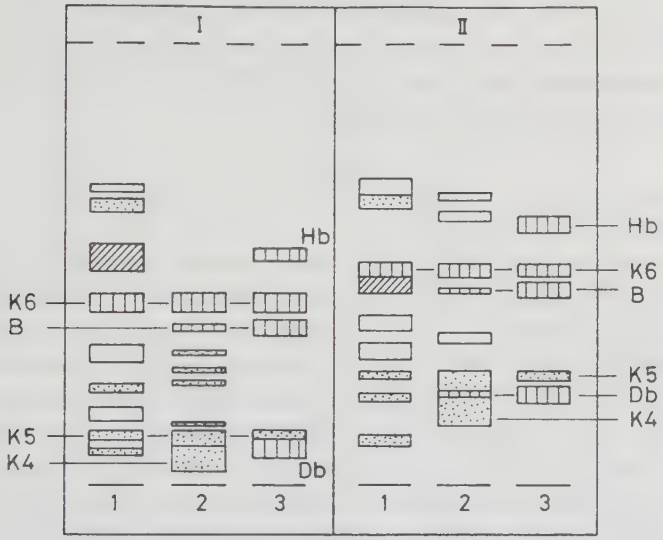
3. Isolierung und Identifizierung von K4, einem neuen Produkt des Thermoabbaus von Didrovaltratum

a. Gewinnung und Dünnschichtchromatographie

Zur Untersuchung des Abbauverhaltens der Valepotriate in Lösung bei höherer Temperatur als der Siedetemperatur des Ethanols (78° C) sowie zur eventuellen Ausbeutesteigerung an K6, das im ethanolischen Soxhlet-Extrakt nur in geringer Menge vorkommt, wurde der lösungsmittelfreie Soxhlet-Extrakt in Wasser aufgelöst und alsdann mehrere Tage mit Toluol (Siedetemperatur 110° C) in einem Perforator extrahiert. Anschließend wurde der Toluol-Auszug unter Vakuum eingeengt und der Rückstand in Ether gelöst. Zur Abtrennung der im Vergleich zu den genuinen Valepotriaten hydrophileren Abbauprodukte wurde die Etherphase mehrfach mit Wasser ausgeschüttelt. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden im Vakuum zur Trockne eingeengt und der Rückstand in Ether aufgenommen.

Bei der DC-Untersuchung des Extrakts (Abb. 25) fielen, neben drei im sichtbaren Licht gelben Banden, zwei im kurzwelligen UV (254 nm) fluoreszenzmindernde Banden durch ihre relative Größe auf. Bei den drei gelben Substanzen handelt es sich um Desacylbaldrinal, Baldrinal und K6. Dies wurde durch die Anfertigung von IR-Spektren und DC-Untersuchungen mit Referenzsubstanzen und verschiedenen Fließmitteln nachgewiesen. Für die Auftrennung des Toluol-Extrakts am geeignetsten erwies sich Ether-Petrolether (85/15). Wie die Abbildung 25 zeigt, ist im Vergleich zum Fließmittel Toluol-Ethylacetat nur bei Ether-Petrolether das Desacylbaldrinal als schwache Bande zu erkennen. Die erwartete relative Ausbeutesteigerung an K6 im Vergleich zum Soxhlet-Extrakt ließ sich nicht nachweisen. Die Hauptbanden bildeten statt dessen die beiden fluoreszenzmindernden Substanzen direkt unter und über der Bande des Desacylbaldrinals. Wie vergleichende DC-Untersuchungen mit Referenzsubstanz und verschiedenen Fließmitteln sowie die Bildung des charakteristischen ockerfarbenen 2,4-Dinitrophenylhydrazons bei Verwendung des DNPH-Sprühreagenzes zeigten, handelt es sich bei der Bande oberhalb des Desacyl-

Abb. 25: Dünnschichtchromatogramm des hydrophilen Anteils des Toluol-Extrakts im Vergleich zu Referenzsubstanzen der Baldrinale und K5



Hb Homobaldrinal B Baldrinal
Db Desacylbaldrinal

1 Ethanolischer Soxhlet-Extrakt
2 Hydrophiler Anteil des Toluol-Extrakt
3 Referenzsubstanzen

I Toluol-Ethylacetat (83/17)
II Ether-Petrolether (85/15)

Detektion: 1. UV 254 nm
2. DNPH-Eisessig-Salzsäure oder
NBP-Triethylamin-Aceton

sichtbar im kurzwelligen UV (254 nm)

gelb

rot

baldrinals um K5 (5-Hydroxymethyl-furfural), das bereits im Soxhlet-Extrakt nachzuweisen war. Die Identität wurde zusätzlich noch durch ein IR-Spektrum sichergestellt. Die Hauptbande des Toluol-Extrakts, die sich unter der Bande des Desacylbaldrinals befindet, erhielt die Laborbezeichnung K4. Nach Besprühen mit DNPH zeigt K4 eine rotviolette Färbung, aber keine Färbung durch NBP.

b. Isolierung

Wie bereits zur Isolierung von K6 erwies sich auch bei der präparativen SC-Vortrennung des hydrophilen Anteils des Toluol-Extrakts an Kieselgel Ether-Petrolether (85/15) als Fließmittel geeignet. Die SC-Abtrennung des K4 von Desacylbaldrinal und K5 gelang aber wegen der eng beieinander liegenden Rf-Werte auch mit diesem Fließmittel nicht. Die Trennung der drei Substanzen mußte daher, da Kristallisationsversuche mit verschiedenen Lösungsmitteln wie Hexan-Butanon-(2) und Ether-Petrolether mißlangen, auch hier durch präparative DC erfolgen. Als Fließmittel wurden neben Toluol-Ethanol (80/20) und Ether-Petrolether (85/15) auch Ether verwendet, wobei jeweils mehrfach entwickelt wurde. Insbesondere die Abtrennung von Desacylbaldrinal gelang mit Ether am besten. Verfahrensbedingt mußten wieder erhebliche Ausbeuteverluste hingenommen werden. Wie bei der Isolierung von K6 und K5 waren bei jedem Reinigungsschritt braune am DC-Start zurückbleibende Polymerverbindungen zu beobachten. Nach Auflösung der DC-reinen Substanz K4 in Ether schieden sich nach mehrtägiger Lagerung bei -18° C hellgelbe Kristalle aus. Nach Umkristallisation aus Ether-Petrolether wurden Kristalle mit einem Schmelzpunkt von $59^{\circ} - 62^{\circ}$ C erhalten (Ausbeute bezogen auf die getrocknete Ausgangsdroge: etwa 0,05%).

c. Strukturaufklärung

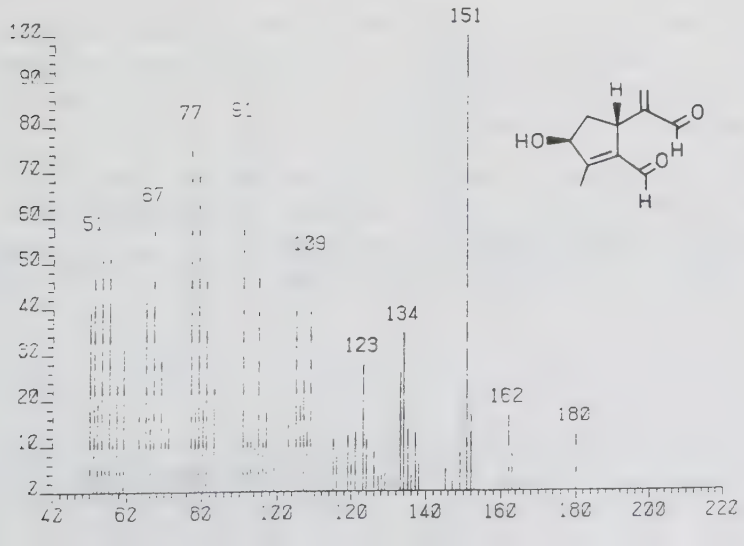
Mit Hilfe der Elementaranalyse (Tab. 5) und des Massenspektrums (Abb. 26) wurde die Summenformel $C_{10}H_{12}O_3$ ermittelt. Ferner errechnen sich aus der CH-Analyse von K4 fünf Doppelbindungsäquivalente. Dabei könnten es sich aufgrund des UV-Spektrums um konjugierte Doppelbindungen handeln (Tab. 5).

Tab. 5: Physikochemische Daten von K4

Molekülpeak, M^+	180
CH-Analyse*	Gef.: C: 66,65; H: 6,71; O: 26,64 Ber.: C: 65,41; H: 6,49; O: 28,10
Summenformel	$C_{10}H_{12}O_3$
α_D^{20}	- 108,22 (c = 0,53% EtOH)
UV-Spektrum λ_{max}	223 nm, log ε = 3,91; 252 nm, log ε = 4,02
Schmelzpunkt	59° - 62° C

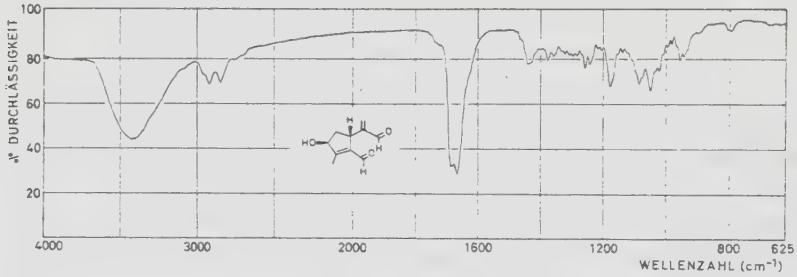
(*Die Sauerstoffwerte sind Differenzwerte)

Abb. 26: Massenspektrum von K4



Aufgrund der Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin handelt es sich bei der Substanz um eine Carbonylverbindung. Allerdings bildeten sich, wie DC-Untersuchungen zeigten, mehrere Hydrazone. Eine Reinigung des Hauptderivats durch Umkristallisation aus Ether-Petrolether gelang nicht. Bei der präparativen DC erwies sich das Derivat als instabil, da bei jedem Reinigungsschritt auch neue Nebenprodukte zu beobachten waren. Auf das Vorliegen einer Carbonylgruppe weist aber auch das IR-Spektrum (Abb. 27) von K4 hin.

Abb. 27: IR-Spektrum von K4



Dabei könnte die starke Bande bei 1665 cm^{-1} sogar auf eine konjugierte Aldehydgruppe zurückzuführen sein. Für das Vorliegen einer Hydroxylfunktion spricht die breite Bande bei 3440 cm^{-1}.

Das in Abbildung 28 wiedergegebene ^{1}H-NMR-Spektrum der Substanz bestätigt das Vorliegen einer Aldehydgruppe. Aufgrund der bei 10,00 ppm und 9,54 ppm auftretenden Signale handelt es sich bei K4 um einen Dialdehyd.

Endgültiger Aufschluß über die Struktur von K4 ergab sich erst aus dem ^{13}C-NMR-Spektrum (Abb. 29), die Zuordnung der Signale ist aus der Tabelle 6 ersichtlich.

Abb. 28: ^{1}H-NMR-Spektrum von K4

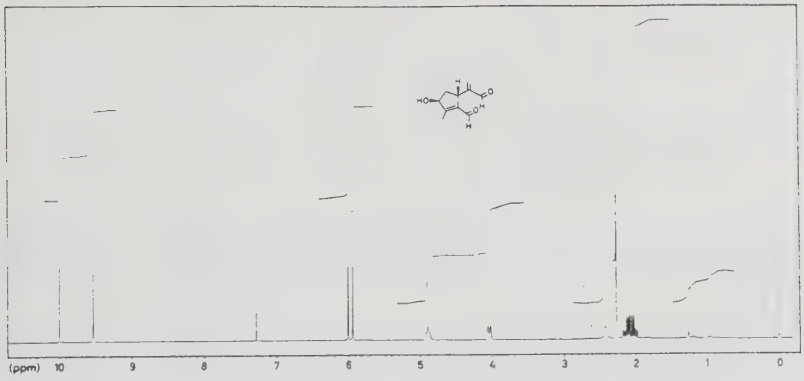
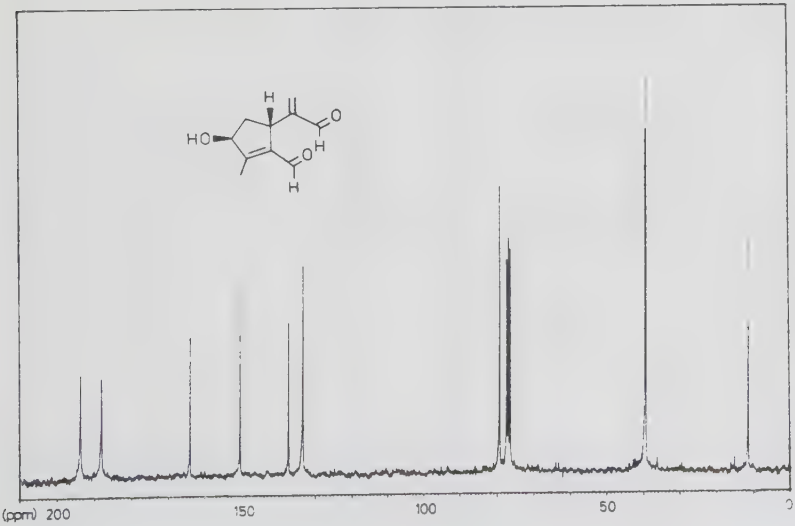
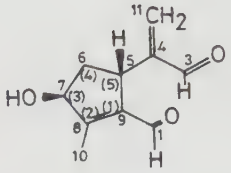


Abb. 29: ^{13}C-NMR-Spektrum von K4



Danach kommt K4 die in Abbildung 30 wiedergegebene Struktur zu.

Abb. 30: K4



Wie die Abbildung 30 zeigt, handelt es sich um den (3S,5R)-5-(1-Formylvinyl)-3-hydroxy-2-methyl-1-cyclopenten-carbaldehyd. Die Zählweise bezieht sich auf die mit eingeklammerten Ziffern bezeichneten C-Atome*). Die Signale der einzelnen C-Atome sind in der Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tab. 6: ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Daten von K4
(Lsgm.: $CDCl_3$; Standard: TMS; Verschiebung in ppm, δ-Werte)

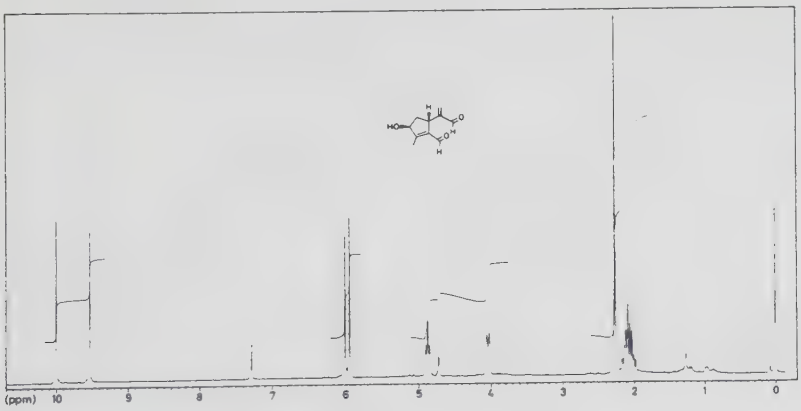
^{1}H-NMR		^{13}C-NMR	M(1)
H-1	10,00 s	C-1	188,27 d
H-3	9,54 s	C-3	193,90 d
		C-4	137,39 s(2)
H-5	4,04 m	C-5	39,69 d
H-6	2,03 (3) 2,11	C-6	39,43 t
H-7	4,89 m	C-7	79,44 d
-OH an C-7	2,42 m		
		C-8	164,15 s
		C-9	150,61 s(2)
H-10	2,26 m	C-10	11,48 q
H-11	5,94 s 6,01 s	C-11	133,45 t

(1) M=Multiplizität im ^{1}H off-resonance entkoppelten Spektrum
(2) im off-res. Spektrum durch geminale Kopplungen als enges d
(3) MN-Teil des AMNX-Systems von H-7,H-6,H-6,H-5

*) Zur Vermeidung von Mißverständnissen wird in den künftigen Formeln von K4 die bei den Valepotriaten geläufige Bezifferung (Ziffern ohne Klammern in Abb. 30) verwendet.

Durch das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 28) konnten daraufhin die Daten des ^{13}C-NMR-Spektrums bestätigt werden. Danach entsprechen die Signale bei 193,90 ppm und 188,27 ppm von C-3 bzw. C-1 im ^{13}C-NMR-Spektrum den bereits durch das ^{1}H-NMR-Spektrum nachgewiesenen zwei Aldehydgruppen. Das starke Singulett bei 2,26 ppm entspricht der Methylgruppe von C-10 (^{13}C-NMR: 11,48 ppm). Das Multiplett bei 2,42 ppm muß der Hydroxygruppe an C-7 (^{13}C-NMR: 79,44 ppm) zugerechnet werden. Dies wurde durch D_2O-Austausch bewiesen. Wie das nach D_2O-Austausch aufgenommene Spektrum in Abbildung 31 zeigt, ist das Multiplett bei 2,42 ppm verschwunden.

Abb. 31: ^{1}H-NMR-Spektrum von K4 nach D_2O-Austausch



4. Physikochemische Eigenschaften einiger aldehydischer Abbauprodukte der Valepotriate

a. Stabilität

Gegenüber Säuren und Basen sind die Substanzen K4 und K6 nicht stabil. Bei pH-Werten < 4 und > 8 treten in Lösung bei Raumtemperatur allmählich auf Polymerisation hinweisende dunkelbraune Verfärbungen auf. Diese Braunfärbungen sind auch bei Aufbewahrung an der Luft - insbesondere auf DC-Platten - zu beobachten.

b. Löslichkeit

Wie die Tabelle 7 zeigt, steigt die Wasserlöslichkeit von Baldrinal über Desacylbaldrinal und Valtroxal zum K6. Am weitaus besten löslich ist der Dialdehyd K4.

Tab. 7: Wasserlöslichkeit der Abbauprodukte

	relative Molekülmasse	%	mMol/l
Baldrinal	218	0,038*	0,90
Desacylbaldrinal	176	0,046*	2,61
Valtroxal	338	0,155*	4,59
K6	204	0,15	7,25
K4	180	5,4	300,0

*WILLEMS, 1980

K4 und K6 sind in Aceton und Diethylether sehr gut, in Methanol und Ethanol gut löslich. K6 löst sich zudem gut in Dichlormethan.

c. Verteilungskoeffizienten (VK)

Als Vorversuch zu den in vivo-Untersuchungen wurden die Verteilungskoeffizienten bestimmt (Tab. 8). Da aus dem VK nur tendenzielle Hinweise auf das Verhalten der Substanz im lebenden Organismus erzielt werden sollten, wurden diese lediglich jeweils einmal bestimmt. Der Verteilungskoeffizient wurde modifiziert nach HELLENBRECHT et al. (1973) ermittelt. Am hydrophilsten ist der Dialdehyd K4; dagegen liegt der VK des Ethers K6 in der Größenordnung von Valtroxal. Die lipophilste der untersuchten Substanzen ist Didrovaltratum.

Tab. 8: Verteilungskoeffizienten von Didrovaltratum und Abbauprodukten der Valepotriate (n-Octanol/Phosphatpuffer pH 7; 20° C)

	VK
Didrovaltratum	75,0
Baldrinal	60,0
Valtroxal	8,4
K4	1,1
K6	10,3

5. Pharmakologische Eigenschaften

a. Akute Toxizität

Die akute Toxizität (LD_{50}) wurde nach LITCHFIELD und WILCOXON (1965) an männlichen NMRI-Mäusen ermittelt, um die ermittelten Ergebnisse mit den Literaturwerten in der Tabelle 9 vergleichen zu können, die ebenfalls mit diesem Mäusestamm bestimmt wurden.

Dazu wurden pro Dosis jeweils zehn Tiere verwendet. Die Tiere wurden in Gruppen von je fünf Tieren gehalten, da die Toxizität einer Substanz davon abhängig sein kann, ob Einzeltiere oder in Gruppen gehaltene Tiere benutzt werden. WALKER (1974) stellte für in Gruppen lebende Mäuse eine um etwa 6 bis 10fach höhere Toxizität von DL-Amphetamin gegenüber isoliert gehaltenen Mäusen bei gleicher Applikationsweise fest.

Die LD_{50} wurde für K4 und K6 nach intraperitonealer und peroraler Applikation bestimmt. Für Baldrinal und Valtroxal wurden die Studien nur nach peroraler Applikation ausgeführt, da für die i.p.-Applikation auf Literaturwerte zurückgegriffen werden konnte.

Tab. 9: Akute Toxizität bei der Maus bezogen auf mMol/kg und mg/kg

	i.p.		p.o.	
	mMol/kg	mg/kg	mMol/kg	mg/kg
Didrovaltratum	0,29	125[b.]	>10,85	>4600[b.]
Baldrinal	2,13	465[a.]	> 5,87	>1280
Valtroxal	0,25	83[a.]	> 3,79	>1280
K4	0,39	71	1,51	272
K6	1,87	336	> 6,27	>1280

a. WILLEMS, 1980 b. EICKSTEDT und RAHMAN, 1969

Wie die Tabelle 9 zeigt, weist K4 im Vergleich zum Didrovaltratum bezogen auf mMol/kg bei intraperitonealer Applikation

eine geringere, bei peroraler Gabe eine bedeutend höhere Toxizität auf.

K6 weist bei intraperitonealer Applikation eine geringere Toxizität als Valtratum (0,15 mMol/kg; EICKSTEDT, RAHMAN, 1969) auf, aber eine in der gleichen Größenordnung wie das verwandte Baldrinal liegende.

Mit Ausnahme von K4 weisen alle aufgeführten Substanzen bei peroraler Gabe eine LD_{50} von über einem Gramm pro Kilogramm Körpergewicht auf.

b. Die Beeinflussung der Motilität bei der Maus

Ziel der Studie war es, herauszufinden, ob die neuen Produkte K4 und K6 eine zentrale Wirkung haben und ob gegebenenfalls eine Dosisabhängigkeit feststellbar ist. In die Untersuchungen wurden zusätzlich Baldrinal und Valtroxal einbezogen. Als Vergleichssubstanz diente Didrovaltratum. Dieses ist zum einen als Hauptvalepotriat der Didrovaltratumtrasse von Valeriana wallichii DC. relativ einfach in kristalliner Form isolierbar und zum anderen das am stärksten sedierende der von WAGNER et al. (1980) untersuchten Valepotriate.

Von den zahlreichen in der Literatur beschriebenen Möglichkeiten zum Nachweis der Wirkung zentral sedierender Stoffe wählten wir das Verfahren der Messung der Spontanmotilität aus.

Zu Beginn der Untersuchungen stellte sich die Frage, ob die Motilitätsversuche mit Einzeltieren oder mit Tiergruppen durchgeführt werden sollten. Nach HENRY et al. (1971) gilt eine Gruppengröße von 5-12 Tieren als optimal, da in größerer und kleinerer Zahl gehaltene Tiere einer unspezifischen Streßsituation ausgesetzt sind, in der z.B. der Stoffwechsel von Noradrenalin beeinflußt wird. Die Unterschiede zeigen sich beispielsweise in einer erhöhten lokomotorischen Aktivität von isoliert gehaltenen Mäusen im Vergleich zu Tiergruppen nach intraperitonealer Gabe von physiologischer Kochsalzlösung (POZO et al., 1978). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden für die Versuche Gruppen von jeweils fünf Mäusen verwendet.

Dies entspricht auch am ehesten der natürlichen Lebensweise der kleinen Nager.

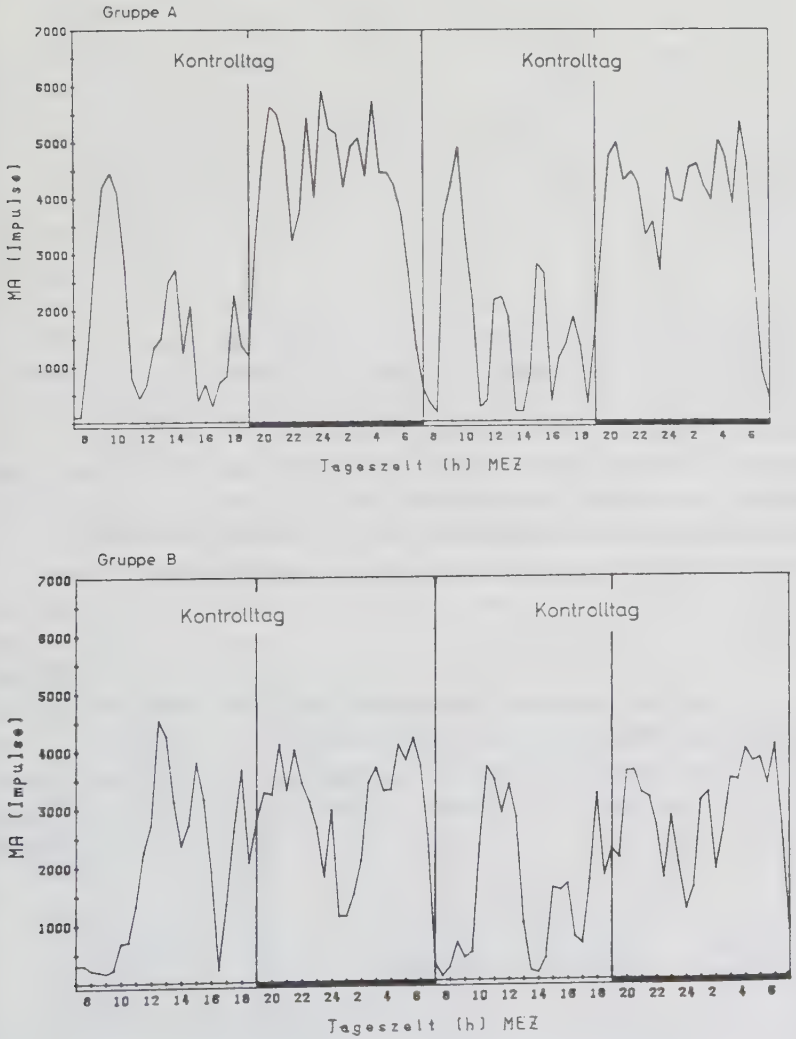
Als Applikationszeit wurde in den ersten Experimenten einheitlich ein morgendlicher Termin ausgewählt, wie auch in der oben angeführten Arbeit von WAGNER et al. (1980) angegeben. Diese Tageszeit wurde auch von WILLEMS (1980; persönliche Mitteilung) genannt.

Bei intraperitonealer Applikation von Testsubstanzen um 10 Uhr ergaben sich, bezogen auf jeweils den vorangegangenen Kontrolltag derselben Mäusegruppe, keine systematischen Veränderungen der motorischen Aktivität der verschiedenen in Parallelansätzen gehaltenen Tiergruppen. Die Ergebnisse konnten daher nicht ausgewertet werden.

Daraufhin wurden Versuche mit Gruppen von Licht-Dunkel-synchronisierten Mäusen (L:D = 12:12 Stunden) durchgeführt. Dazu wurden mit einem Animex-Motimeter die motorischen Aktivitätsimpulse registriert und deren Summe halbstündlich ausgedruckt. Wie die Abb. 32 zeigt, liefert jede der synchronisierten Tiergruppen (hier A und B) unter gleichbleibenden äußeren Bedingungen ein eigenes, circadianes Aktivitätsprofil, das mit kleineren Variationen täglich reproduzierbar nachweisbar ist. Die vergleichsweise gute Reproduzierbarkeit erlaubte es, die Versuche derart durchzuführen, daß jeweils der Tag vor dem Versuchstag zur Kontrolle - im Sinne einer Eigenkontrolle - benutzt werden konnte. Aus den Kurvenverläufen lassen sich auch die in den Vorversuchen bei morgendlicher Applikation beobachteten stark streuenden motorischen Aktivitätswerte erklären. So würde zum Beispiel durch Applikation einer sedierend wirkenden Substanz um 10 Uhr bei der Gruppe A innerhalb der nächsten zwei Stunden eine Verstärkung der bereits aufgrund des natürlichen Rhythmus eintretenden Minderung der motorischen Aktivität zu beobachten sein. Die Applikation zum gleichen Zeitpunkt bei Gruppe B würde hingegen innerhalb des gleichen Zeitraums nur eine mehr oder weniger große Minderung des natürlichen Motilitätsanstiegs bewirken.

Demgegenüber treten während der Nacht diese Probleme weitaus weniger deutlich auf. Denn, wie die Abbildung 32 zeigt, steht

Abb. 32: Motorische Aktivität (MA) von zwei Gruppen (A, B) von fünf licht-dunkel-synchronisierten männlichen NMRI-Mäusen über 48 Stunden

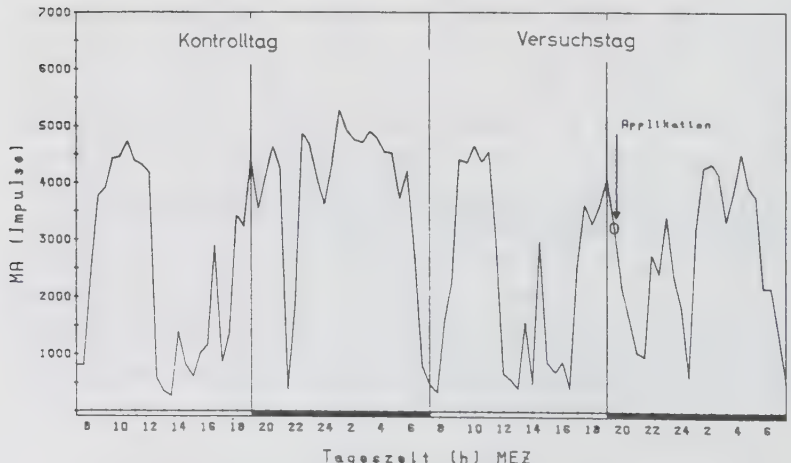


den tagsüber stark schwankenden motorischen Aktivitäten ein hohes nächtliches Aktivitätsniveau mit vergleichsweise geringen Schwankungen gegenüber. Bei den folgenden Versuchen wurden daher die Substanzen um 19:30 MEZ, d.h. eine halbe Stunde nach Beginn der Nacht appliziert. Dieser Termin hat außerdem den Vorteil, daß hier auf eine künstliche Stimulation der bekanntlich nachtaktiven Mäuse, deren motorische Aktivität negativ mit der Beleuchtungsstärke korreliert ist (ASCHOFF, 1963), verzichtet werden kann, so daß mit sedierend wirkenden Substanzen die Beeinflussung der natürlichen Motilität gemessen wird.

α. Beeinflussung der motorischen Aktivität nach intraperitonealer Applikation der Testsubstanzen

Als Beispiel ist in Abbildung 33 die Wirkung von 20 mg/kg Baldrinal i.p. nach vorangegangener Kontrollnacht bei einer Gruppe von fünf Mäusen dargestellt. Wie die Abbildung 33 zeigt, ist in den ersten Stunden nach der Applikation eine deutliche Verminderung der motorischen Aktivität festzustellen.

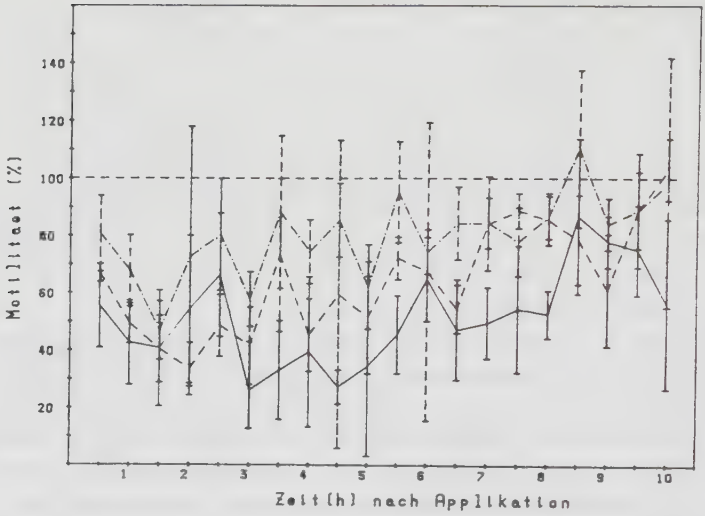
Abb. 33: Einfluß von Baldrinal (20 mg/kg) auf die halbstündlich registrierte motorische Aktivität einer Gruppe von fünf synchronisierten Mäusen



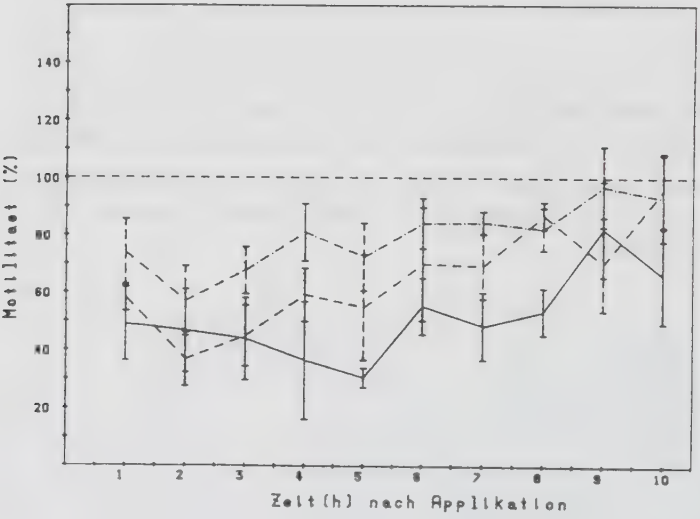
Dies zeigt sich auch bei Betrachtung der prozentualen motorischen Aktivitäten in Bezug auf die entsprechenden Zeitabschnitte der Kontrollnacht.In Abbildung 34 a sind jeweils die Mittelwerte von fünf Tiergruppen mit den relativen Standardabweichungen in drei Dosisbereichen dargestellt.Die Registrierung erfolgte in 30 Minuten Abständen.Bei 20 mg/kg Baldrinal i.p. ist nach 1,5 Stunden eine Hemmung der Motilität auf 47 % gegenüber der Kontrollnacht festzustellen.Dann läßt die Wirkung langsam nach und ist 8,5 Stunden nach Applikation abgeklungen.Beim Vergleich der drei Motilitätskurven ist im allgemeinen eine Dosisabhängigkeit sowohl hinsichtlich der Stärke als auch der Dauer der Wirkung feststellbar.Wie die Kurven der Abbildung 34 a zeigen,erscheinen Oszillationen,die den Überblick erschweren.Ein ähnliches Bild ergaben bereits die Vorversuche mit unbehandelten Tiergruppen (Abb.32),bei denen auch während nächtlicher Messung die Spontanmotilitäten oszillierten,d.h. Anzahl und Zeitpunkt der motorischen Aktivitätsmaxima können bei jeder Tiergruppe im Vergleich zur vorangegangenen Kontrollnacht schwanken.Die Größe der Oszillationen zeigt sich auch bei den relativen Standardabweichungen.Diese weisen bei der halbstündlichen Darstellung in Abbildung 34 a relativ große Unterschiede mit Maximalwerten um 100 % auf.Demgegenüber stören die Motilitätsoszillationen bei der stündlichen Darstellung in Abbildung 34 b fast nicht mehr.Dies zeigt sich auch durch die vergleichsweise kleineren relativen Standardabweichungen,die in der Regel Werte unter 30 % aufweisen.Zur Erleichterung der Übersichtlichkeit ist bei den folgenden Motilitätskurven auf die Wiedergabe der Standardabweichungen verzichtet worden.Bei diesen Darstellungen werden auch nur noch die Stundenwerte wiedergegeben,wie bei der folgenden Abbildung 35.

Abb.34 a+b: Veränderungen der durchschnittlichen motorischen Aktivität über jeweils 30 Minuten (a) und eine Stunde (b) in Prozent gegenüber der Kontrollnacht (= 100%) in Abhängigkeit von der Zeit nach i.p. Applikation von Baldrinal

34 a:



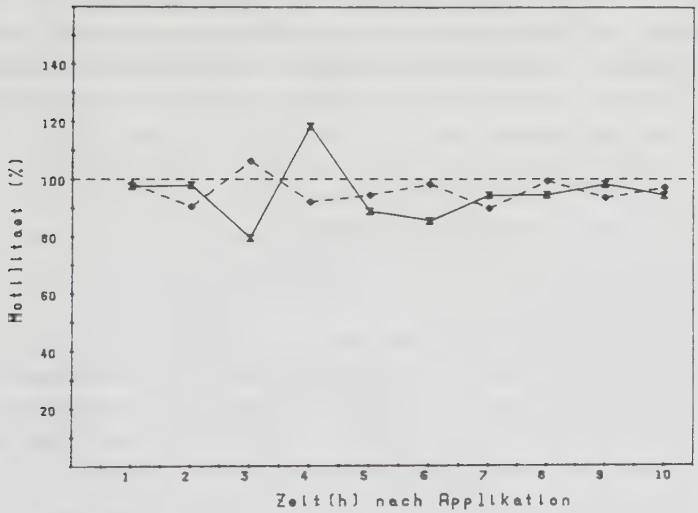
34 b:



20 mg/kg -·-·-·-
40 mg/kg - - - -
80 mg/kg ------

n = 5 $\bar{x} \pm s_{rel}$

Abb. 35: Veränderungen der durchschnittlichen motorischen Aktivität über jeweils 60 Minuten in Prozent gegenüber der Kontrollnacht (= 100%) in Abhängigkeit von der Zeit nach i.p. Applikation von physiologischer Kochsalzlösung im Vergleich zu unbehandelten Mäusen



unbehandelte Mäuse --•--
NaCl 0,9% i.p. —•—

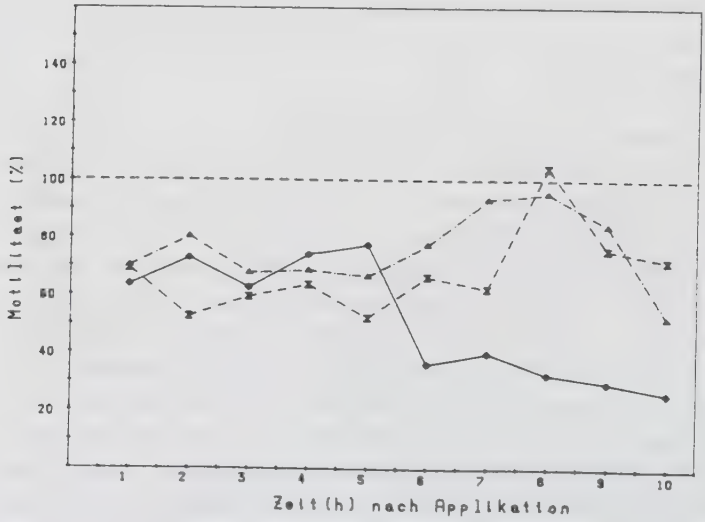
n = 5

Bei der Gegenüberstellung der motorischen Aktivitäten von jeweils fünf Gruppen unbehandelter und NaCl-(i.p.) behandelter Mäuse ist ein Applikationseffekt nicht zu erkennen. Ein solcher Effekt wird auch durch kumulative Addition der Halbstundenwerte über 10 Stunden nach der Applikation und Berechnung der durchschnittlichen motorischen Aktivität in Prozent nicht signifikant sichtbar. Wie in der Tabelle 10 auf Seite 60 dargestellt, zeigen die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Tiere zehn Stunden nach Applikation 94,2% der motorischen Aktivität gegenüber dem entsprechenden Zeitraum der Kontrollnacht. Aber wie ein Vergleich mit unbehandelten Mäusen zeigt, ist auch bei diesen mit Motilitätsschwankungen in ähnlicher Größenordnung zu rechnen. Die absoluten Impulssummen unbehandelter Mäusegruppen in dem genannten Zeitraum betrugen meist zwischen 60.000 und 80.000.

Didrovaltratum:

Alle Dosen von Didrovaltratum bewirken bereits eine halbe Stunde nach intraperitonealer Applikation eine Verminderung der Motilität gegenüber der Kontrollnacht (Abb. 36). Eine Dosisabhängigkeit zeigt sich nicht sehr ausgeprägt.Wie aus der Tabelle 10 (S. 60) hervorgeht,wird die dosisabhängige Motilitätshemmung erst durch Kumulation der Impulse deutlich.Abgesehen von einigen Oszillationen in der ersten Nachthälfte zeigen 40 mg/kg die ausgeprägteste und anhaltenste Wirkung.Zehn Stunden nach der Applikation wird die maximale Wirkung mit 26% erreicht.

Abb. 36: Veränderungen der durchschnittlichen motorischen Aktivität über jeweils 60 Minuten in Prozent gegenüber der Kontrollnacht (= 100%) in Abhängigkeit von der Zeit nach i.p. Applikation von Didrovaltratum



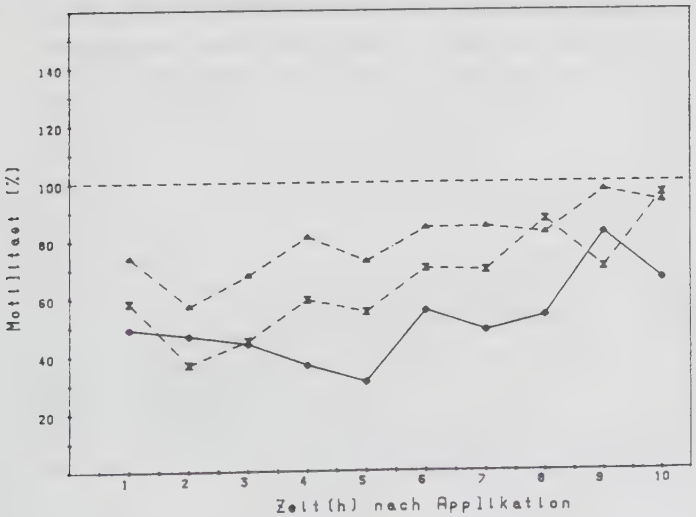
10 mg/kg
20 mg/kg
40 mg/kg

n = 5

Baldrinal:

Wie bereits erwähnt, zeigt sich bei Baldrinal nach intraperitonealer Gabe eine dosisabhängige Verminderung der Motilität (Abb. 37). Die Wirkung setzt bei allen Dosen bereits während der ersten Stunde ein und läßt erst am Ende der Nacht nach. Als maximaler Effekt ist 5 Stunden nach der Applikation bei der höchsten Dosis nur noch eine durchschnittliche motorische Aktivität von 30,6% festzustellen. Die dosisabhängige Wirkung zeigt sich auch bei Kumulation der Impulse (Tab. 10, S. 60).

Abb. 37: Veränderungen der durchschnittlichen motorischen Aktivität über jeweils 60 Minuten in Prozent gegenüber der Kontrollnacht (= 100%) in Abhängigkeit von der Zeit nach i.p. Applikation von Baldrinal



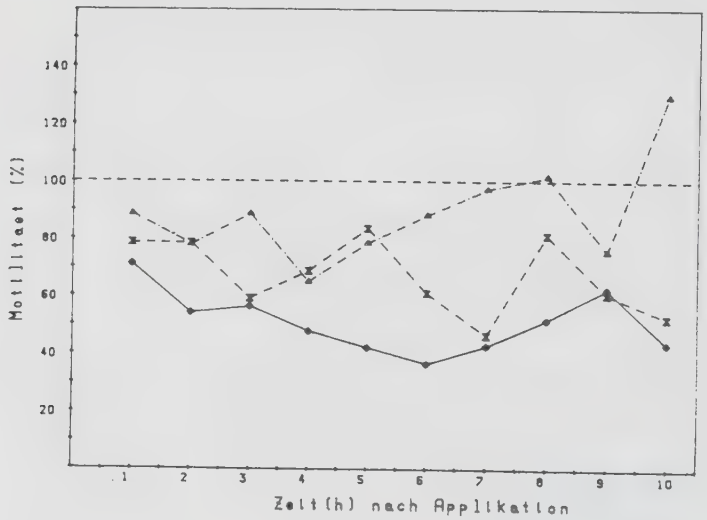
20 mg/kg --▲--
40 mg/kg --⧗--
80 mg/kg —●—

n = 5

Valtroxal:

Eine Verminderung der Motilität tritt bereits im Verlauf der ersten Stunde ein (Abb. 38).Innerhalb drei Stunden deuten sich bei Dosen von 5, 10 und 20 mg/kg Valtroxal i.p. dosisabhängige motilitätssenkende Effekte an. Die Dosisabhängigkeit wird, wie die Tabelle 10 (S. 60) zeigt, durch Kumulation der Impulse deutlicher. Während bei der niedrigsten Dosis die motilitätssenkende Wirkung bereits nach acht Stunden aufhört,hält sie bei den höheren Dosen auch am Ende des Versuchs noch an.Die maximale durchschnittliche Wirkung wird nach 6 Stunden bei 20 mg/kg mit einer Motilität von 36,4% im Vergleich zur Kontrollnacht erreicht.

Abb. 38: Veränderungen der durchschnittlichen motorischen Aktivität über jeweils 60 Minuten in Prozent gegenüber der Kontrollnacht (= 100%) in Abhängigkeit von der Zeit nach i.p. Applikation von Valtroxal



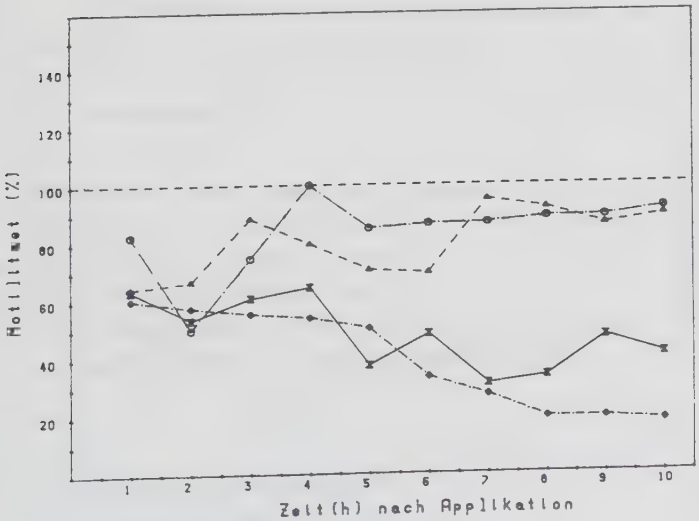
5 mg/kg
10 mg/kg
20 mg/kg

n = 5

K4:

Innerhalb der ersten drei Stunden nach intraperitonealer Applikation von K4 zeigt sich bei allen vier geprüften Dosen eine deutliche Verminderung der Motilität (Abb. 39). Eine Dosisabhängigkeit ist nach dieser Zeitspanne beim Vergleich der Kurvenpaare 2,5/5 mg/kg und 10/20 mg/kg bereits angedeutet. Deutlicher wird die dosisabhängige Wirkung auch zwischen 2,5 und 5 mg/kg K4 durch Kumulation der Motilitätsimpulse (Tab. 10, S. 60). In der zweiten Nachthälfte sind die Wirkungen der niedrigeren Dosen praktisch erloschen. Bei den höheren Dosierungen werden dosisabhängige, minimale Aktivitätsniveaus mit 30,6% bzw. 17,6% erst nach 7 bzw. 10 Stunden erreicht.

Abb. 39: Veränderungen der durchschnittlichen motorischen Aktivität über jeweils 60 Minuten in Prozent gegenüber der Kontrollnacht (= 100%) in Abhängigkeit von der Zeit nach i.p. Applikation von K4



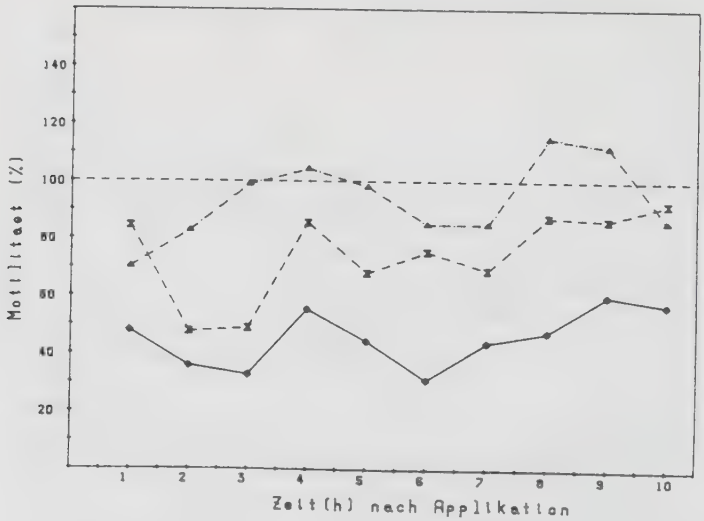
2,5 mg/kg
5 mg/kg
10 mg/kg
20 mg/kg

n = 5

K6:

K6 bewirkt,wie die Abbildung 40 zeigt,eine deutlich dosisabhängige Hemmung der motorischen Aktivität,abgesehen von einer vermutlich zufallsbedingten Hypermotilität nach der ersten Stunde bei der mittleren Dosis.Sehr deutlich zeigt sich die Dosisabhängigkeit nach Kumulation der Impulse (Tab. 10, S. 60). Die Wirkung der niedrigsten Dosis ist innerhalb drei Stunden erloschen.Die Wirkdauer von 20 mg/kg beträgt etwa 8 - 10 Stunden,und bei 40 mg/kg reicht sie über das Ende des Versuchs hinaus.Die maximale Wirksamkeit wird bei der höchsten Dosis nach 6 Stunden mit einer prozentualen Motilitätshemmung auf 30,9% erreicht.

Abb. 40: Veränderungen der durchschnittlichen motorischen Aktivität über jeweils 60 Minuten in Prozent gegenüber der Kontrollnacht (= 100%) in Abhängigkeit von der Zeit nach i.p. Applikation von K6



10 mg/kg
20 mg/kg
40 mg/kg

n = 5

Die geprüften Verbindungen zeigten bei Darstellung der Impulsraten über jeweils 60 Minuten nicht selten eine mehr oder weniger ausgeprägte Abhängigkeit von der Dosis zur Wirkung. Zur Verdeutlichung und Beurteilung dieser Beziehungen wurden die prozentualen motorischen Aktivitäten in ein Wahrscheinlichkeitsnetz eingetragen (Abb. 41). Um eventuelle Korrelationen mit den Verteilungskoeffizienten der Substanzen aufzuklären, wurde neben der Darstellung in mg/kg auch diejenige in mMol/kg berücksichtigt (Abb. 42). Zur Ermittlung der halbmaximalen Hemmungen der motorischen Aktivitäten wurden aber keine einzelne Abschnitte der in den Abbildungen 35 - 40 dargestellten Motilitätskurven direkt verwendet, da deren Auswertungen durch die überlagerten Motilitätsoszillationen erschwert sind. Sinnvoll erschien es dagegen, eine kumulative Addition der Meßimpulse über einen längeren Zeitraum vorzunehmen, da dadurch die meist kürzer - in der Regel ein bis zwei Stunden - andauernden Oszillationen ausgeglichen werden. Der für die Berechnung der ED_{50}-Werte ausgewertete Meßbereich wurde auf die Zeit von 19.30 - 5.30 (10 Stunden) beschränkt, da am Ende der Nachtperiode, wie die Abbildungen 32 und 33 (S. 49, 51) zeigen, bei unbehandelten Mäusen ein starker Abfall der motorischen Aktivität zu beobachten ist, so daß zusätzliche pharmakonbedingte Motilitätshemmungen hier nur schwer erkennbar wären.

Die den Wahrscheinlichkeitsnetzen zugrundeliegenden Daten sind in der Tabelle 10 zusammengefaßt. Bei den eingezeichneten Regressionsgeraden handelt es sich jeweils um die Verbindung zwischen den rechnerisch ermittelten Punkten ED_{16}, ED_{50} und ED_{84}. Diese ED-Werte wurden analog der Bestimmung der LD_{50} (vgl. Exp. Teil 7.a) nach LITCHFIELD und WILCOXON (1965) erhalten.

Tab. 10: Durchschnittliche kumulative, motorische Aktivität 0 - 10 Stunden nach intraperitonealer Applikation der Testsubstanzen in Prozent der individuellen Kontrolle, und im Vergleich zur motorischen Aktivität von Tieren nach Gabe von physiologischer Kochsalzlösung bzw. unbehandelten Tiergruppen
($\bar{x} \pm s$, n = 5 Gruppen à 5 Mäuse)

Substanz	Dosis pro kg		Motorische Aktivitätsimpulse 0 - 10 h					Motorische Aktivität als % der Eigenkontrolle	s_{rel} (%)
	mg	mMol	Kontrolle ($\bar{x}$)	s_{rel} (%)	Verum ($\bar{x}$)	s_{rel} (%)	p^+		
Didrovaltratum	10	0,024	65021	16,5	49101	15,8	<0,01	75,5	10,6
	20	0,047	69413	17,1	46979	23,0	<0,01	67,7	9,5
	40	0,094	60513	8,8	28717	30,8	<0,01	47,5	14,1
Baldrinal	20	0,092	85694	9,9	67968	22,8	<0,02	79,3	11,9
	40	0,183	73946	20,3	48006	10,9	<0,01	64,9	10,5
	80	0,367	67678	51,2	34952	54,1	<0,02	51,6	14,6
Valtroxal	5	0,015	56605	15,3	48776	23,5	n.s.	86,2	16,3
	10	0,030	59130	13,8	39151	20,7	<0,01	66,2	9,7
	20	0,060	65796	15,6	33214	19,5	<0,01	50,5	3,3
K4	2,5	0,014	77901	11,9	64511	10,0	<0,01	82,8	11,8
	5	0,028	71823	13,1	57574	12,0	<0,01	80,2	5,5
	10	0,056	67860	14,6	32123	15,0	<0,01	47,4	9,4
	20	0,112	81362	24,9	31221	33,1	<0,01	38,4	17,6
K6	10	0,049	71421	8,6	66315	12,3	n.s.	92,9	5,6
	20	0,098	65470	15,2	48449	22,0	<0,01	74,0	14,0
	40	0,196	79869	21,1	36258	35,8	<0,01	45,4	16,3
NaCl 0,9%			65820	14,2	61978	12,3	n.s.	94,2	5,2
unbehandelte Mäuse			71676	19,8	68672	14,9	n.s.	95,8	6,5

+) Signifikanzberechnung im Vergleich zu der motorischen Aktivität in den individuellen Kontrollnächten durch den einseitigen, ungepaarten t-Test nach Student (n.s. = nicht signifikant)

Abb. 41: Dosis-Wirkungs-Beziehungen in der motorischen Aktivität in Prozent der Kontrollnacht über 10 Stunden nach Applikation der Testsubstanzen in Abhängigkeit von der Dosierung in mg/kg

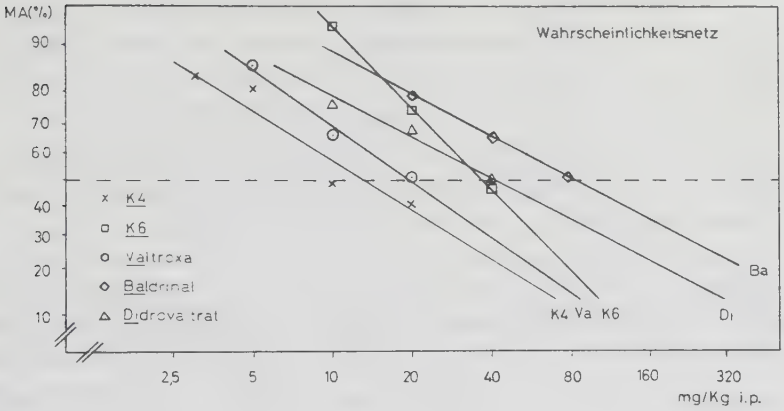
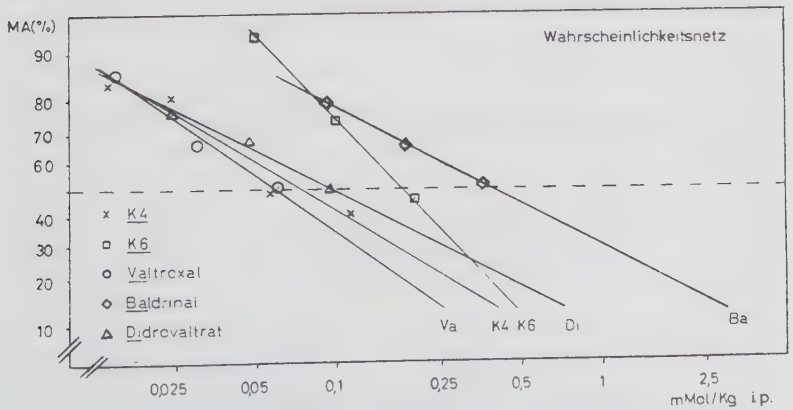


Abb. 42: Dosis-Wirkungs-Beziehungen in der motorischen Aktivität in Prozent der Kontrollnacht über 10 Stunden nach Applikation der Testsubstanzen in Abhängigkeit von der Dosierung in mMol/kg



Aus den partiellen Dosis-Wirkungskurven lassen sich die ED_{50}-Werte entnehmen (Tab. 11).

Tab. 11: Halb-maximale Hemmung der motorischen Aktivität (ED_{50}) in mMol/kg bzw. mg/kg berechnet nach LITCHFIELD und WILCOXON (1965) 0 - 10 Stunden nach i.p. Applikation verschiedener Substanzen

Substanz	mMol/kg	mg/kg
Didrovaltratum	0,093	39,7
Valtroxal	0,058	19,4
K4	0,070	12,5
K6	0,176	35,9
Baldrinal	0,385	84,1

In mMol/kg ergibt sich auf der Grundlage der kumulierten Motilitätsimpulse von 0 bis 10 Stunden nach der Applikation folgende Reihenfolge der Wirksamkeit:

Valtroxal > K4 > Didrovaltratum > K6 > Baldrinal

In mg/kg lautet die entsprechende Wirksamkeitsreihenfolge wie folgt:

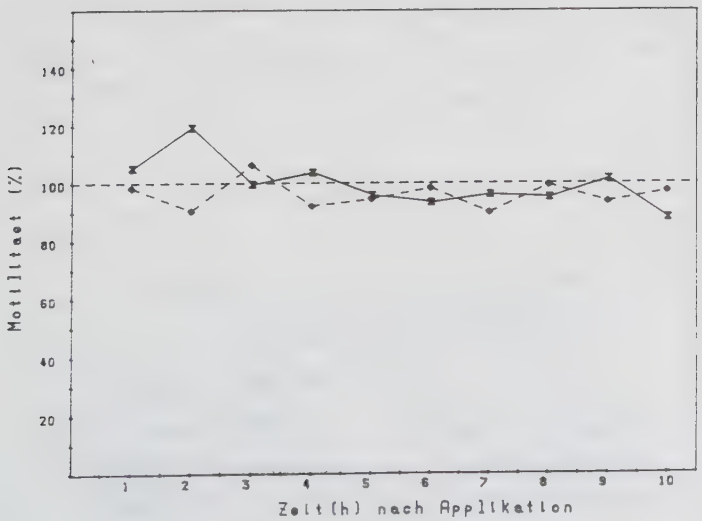
K4 > Valtroxal > K6 > Didrovaltratum > Baldrinal

ß. Beeinflussung der motorischen Aktivität nach peroraler Applikation der Testsubstanzen

Nach peroraler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung zeigt sich im Vergleich zu unbehandelten Mäusen zunächst ein deutlicher anhaltender Applikationseffekt in Form einer Hypermotilität (Abb. 43).
Bei Kumulation der Motilitätsimpulse über 10 Stunden unterscheiden sich die Ergebnisse allerdings nicht von denen der Kontrollnacht, wie aus der Tabelle 12 (S. 70) ersichtlich ist.

Auf den Abbildungen 44 - 48 sind die durchschnittlichen, relativen Wirkungen der getesteten Substanzen auf die motorische Aktivität von Mäusen wiedergegeben. Im allgemeinen wurden die Effekte von drei Dosen, abgestuft in geometrischer Reihe, gegenübergestellt. Zur Erzielung einer deutlicheren Aussage über eine mögliche Dosis-Wirkungs-Beziehung wurden allerdings die Ausgangsdosen von Didrovaltratum und Valtroxal in doppelter und achtfacher Menge appliziert.

Abb. 43: Veränderungen der durchschnittlichen motorischen Aktivität über jeweils 60 Minuten in Prozent gegenüber der Kontrollnacht (= 100%) in Abhängigkeit von der Zeit nach p.o. Applikation von physiologischer Kochsalzlösung im Vergleich zu unbehandelten Mäusen

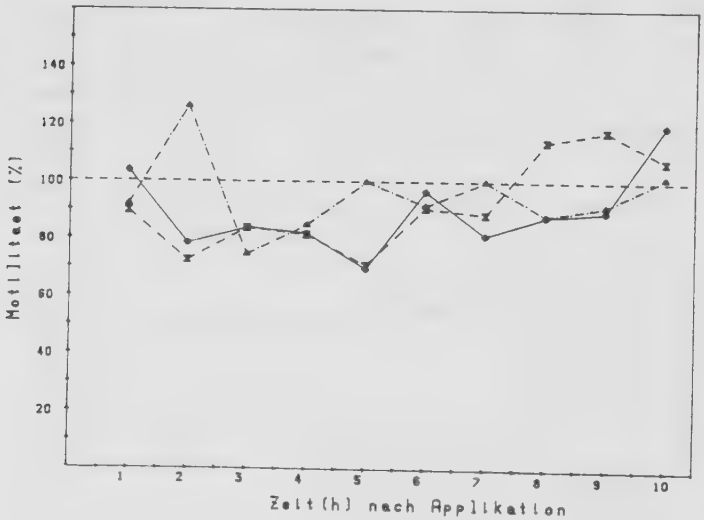


unbehandelte Mäuse --•-- n = 5

Didrovaltratum:

Innerhalb von drei Stunden nach der peroralen Applikation von Didrovaltratum deuten sich zumindest bei den beiden höheren Dosen motilitätsmindernde Effekte an (Abb.44).80 mg/kg und 320 mg/kg bewirken Hemmungen bis auf 70,8% bzw. 69,6% der Kontrolle.Der im kumulativen Verfahren ausgewertete Versuch (Tab. 12, S. 70) zeigt,daß die Aktivitätsminderungen insgesamt kaum außerhalb des Bereichs der Kontrollen liegen. Eine Ausnahme bildet lediglich die mittlere Dosis mit einer schwachen,aber signifikanten Motilitätshemmung.

Abb. 44: Veränderungen der durchschnittlichen motorischen Aktivität über jeweils 30 Minuten in Prozent gegenüber der Kontrollnacht (= 100%) in Abhängigkeit von der Zeit nach p.o. Applikation von Didrovaltratum



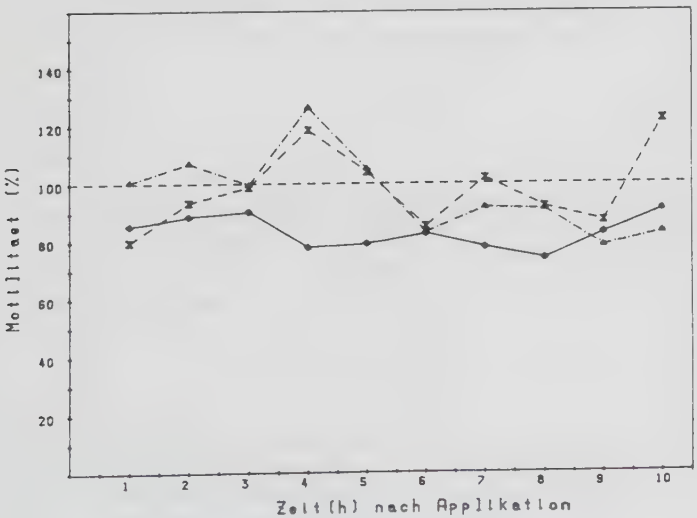
40 mg/kg -·▲·-
80 mg/kg --⧗--
320 mg/kg —●—

n = 5

Baldrinal:

Eine Verminderung der Motilität zeigt sich,wie die Abbildung 45 wiedergibt,nach peroraler Applikation von Baldrinal innerhalb der ersten Stunde nur bei den beiden höchsten Dosen. Während die Wirkung bei 160 mg/kg bereits nach drei Stunden abgeklungen ist,hält diese bei der höchsten Dosis im Verlauf des ganzen Versuchs an.Bei 320 mg/kg Baldrinal ist aber zu berücksichtigen,daß der bei dieser Dosis erforderliche Zusatz von Tween 80 hier selbst einen Effekt in ahnlicher Größenordnung bewirkt,wie ein Vergleich mit der Abbildung 51 (S. 82) zeigt.Für Baldrinal ist eine dosisabhängige Wirkung unter diesen Umständen nicht zu erkennen. Diese Aussage gilt auch für die kumulativ ermittelten Werte (Tab. 12, S. 70).

Abb. 45: Veränderungen der durchschnittlichen motorischen Aktivität über jeweils 60 Minuten in Prozent gegenüber der Kontrollnacht (= 100%) in Abhängigkeit von der Zeit nach p. o. Applikation von Baldrinal



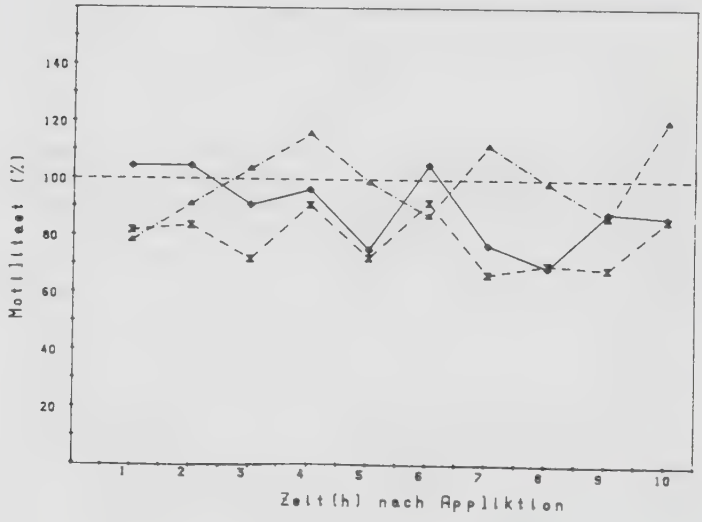
80 mg/kg
160 mg/kg
320 mg/kg + 25 mg/kg Tween 80®

n = 5

Valtroxal:

Valtroxal bewirkt, wie die Abbildung 46 zeigt, in Dosierungen von 20 bzw. 40 mg/kg eine Hemmung der Motilität zu Versuchsbeginn und bei der höheren der beiden Dosen auch in der zweiten Nachthälfte. Bemerkenswerterweise führt die höchste applizierte Dosis von 160 mg/kg zu einer Hypermotilität in der ersten Nachthälfte und dies trotz der motilitätsmindernden Wirkung des zugesetzten Hilfsstoffs Tween 80® selbst, wie ein Vergleich mit der Abbildung 51 (S. 82) zeigt. Eine Dosisabhängigkeit in der Wirkung kann nicht ermittelt werden, weil 20 mg/kg wirkungslos sind und durch den Tensidzusatz bei 160 mg/kg nicht vergleichbare Verhältnisse vorliegen.

Abb. 46: Veränderungen der durchschnittlichen motorischen Aktivität über jeweils 60 Minuten in Prozent gegenüber der Kontrollnacht (= 100%) in Abhängigkeit von der Zeit nach p.o. Applikation von Valtroxal



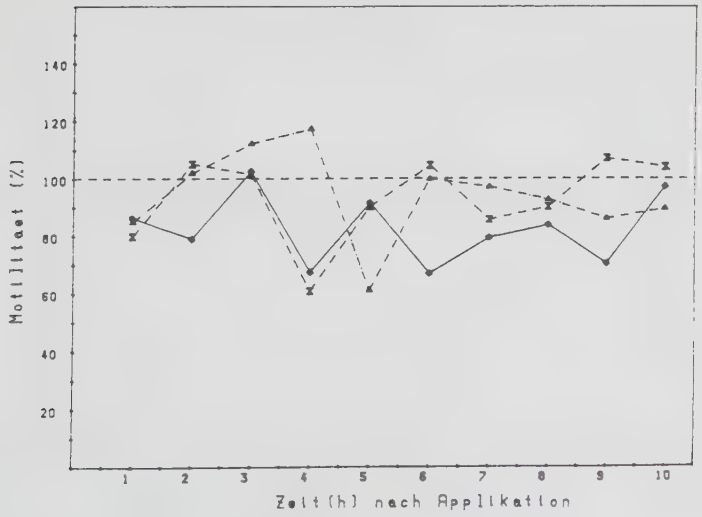
20 mg/kg
40 mg/kg
160 mg/kg + 25 mg/kg Tween 80®

n = 5

K4:

Die Applikation steigender Mengen K4 führt bei Betrachtung der jeweiligen 60 - Minutenwerte zu wenig übersichtlichen Kurvenverläufen,die besonders bei den beiden niedrigeren Dosierungen kaum Tendenzen einer Dosisabhängigkeit erkennen lassen.Lediglich die höchste Dosis liegt nahezu im gesamten Kurvenverlauf einigermaßen gleichmäßig unter dem Niveau der 100% - Werte.Bei den kumulierten Motilitätswerten ist eine schwache Dosisabhängigkeit der Wirkungen der beiden höchsten Dosen erkennbar.Diese stützt sich allerdings auf nicht signifikante Werte (Tab. 12, S. 70).

Abb. 47: Veränderungen der durchschnittlichen motorischen Aktivität über jeweils 60 Minuten in Prozent gegenüber der Kontrollnacht (= 100%) in Abhängigkeit von der Zeit nach p.o. Applikation von K4



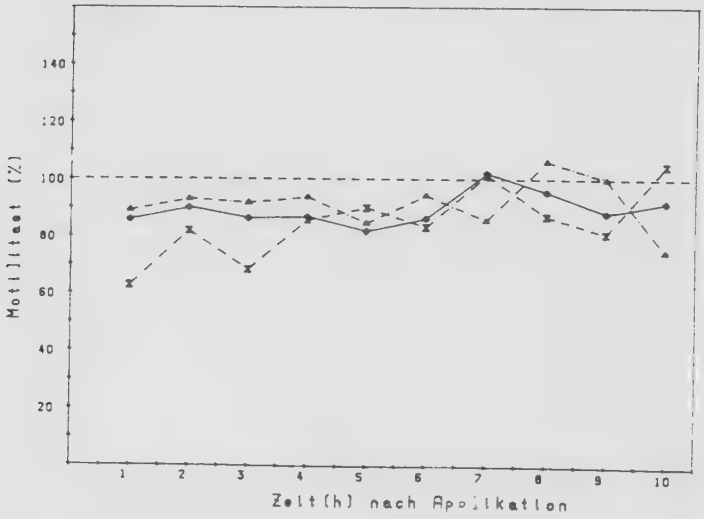
20 mg/kg
40 mg/kg
80 mg/kg

n = 5

K6:

K6 führt nach peroraler Applikation bei allen Dosierungen zu einer leichten Hemmung der Motilität (Abb. 48).Eine Dosisabhängigkeit zeigt sich zu Versuchsbeginn nur in Bezug auf die beiden niederen Dosen.Die relativ schwache Wirksamkeit der höchsten Dosis (160 mg/kg) könnte,wie bereits bei Valtroxal besprochen,auf den auch hier erforderlichen Hilfsstoffzusatz zurückzuführen sein.Die in der Tabelle 12 mitgeteilten kumulierten Motilitätswerte lassen ebenfalls nur für 40 und 80 mg/kg eine Dosisabhängigkeit erkennen,der jedoch nur bei der höheren Dosis signifikante Werte zugrunde liegen.

Abb. 48: Veränderungen der durchschnittlichen motorischen Aktivität über jeweils 60 Minuten in Prozent gegenüber der Kontrollnacht (= 100%) in Abhängigkeit von der Zeit nach p.o. Applikation von K6



Zum Vergleich der Wirkungen der peroral getesteten Substanzen untereinander und mit den entsprechenden nach intraperitonealer Applikation ermittelten Werten wurden wie bei der Aufstellung der Tabelle 10 die kumulierten Motilitätsmeßimpulse über einen Zeitraum von 10 Stunden nach Applikation für die Berechnung der durchschnittlichen Aktivität in Prozent der entsprechenden individuellen Kontrollen verwendet (Tab. 12). Wie aus der Tabelle hervorgeht, sind in der Regel signifikante Dosis-Wirkungs-Beziehungen nicht erkennbar. Die Verwendung von Wahrscheinlichkeitsnetzen erübrigt sich daher, d.h. eine Berechnung von ED_{50}-Werten ist im nicht sinnvoll. So zeigen sich bei Baldrinal, abgesehen von der höchsten durch das Tensid beeinflußten Dosis, und Didrovaltratum jeweils nur angedeutete Dosisabhängigkeiten. Auch bei K4 deutet nur die Motilitätshemmung bei der höchsten Dosis auf eine Dosisabhängigkeit hin. Eine Dosisabhängigkeit ist auch bei Valtroxal und K6 angedeutet, bei denen jeweils die mittlere Dosis eine stärkere Motilitätshemmung bewirkte als die niedrigere Dosis. Bei beiden Substanzen lassen sich die mit der jeweils höchsten Dosis erzielten Ergebnisse nicht vergleichen, da sie wahrscheinlich durch den Zusatz des Tensids beeinflußt sind.

Tab. 12: Durchschnittliche kumulative, motorische Aktivität 0 - 10 Stunden nach peroraler Applikation der Testsubstanzen in Prozent der individuellen Kontrolle, und im Vergleich zur motorischen Aktivität von Tieren nach Gabe von physiologischer Kochsalzlösung sowie von Tween 80® ($\bar{x} \pm s$, n = 5 Gruppen à 5 Mäuse)

Substanz	Dosis pro kg		Motorische Aktivitätsimpulse 0 - 10 h					Motorische Aktivität als % der Eigenkontrolle	s = s_{rel} (%)
	mg	mMol	Kontrolle ($\bar{x}$)	s_{rel} (%)	Verum ($\bar{x}$)	s_{rel} (%)	p[a.]		
Didrovaltratum	40	0,094	67887	7,1	64229	13,6	n.s.	94,6	8,4
	80	0,188	69503	8,7	63115	6,1	<0,02	90,8	5,3
	320	0,752	66577	17,8	58577	10,5	n.s.	88,0	14,2
Baldrinal	80	0,367	61032	25,3	58631	22,8	n.s.	96,1	11,0
	160	0,734	64329	16,2	61796	22,0	n.s.	96,1	9,9
	320[b.]	1,468	65577	11,9	54299	16,3	<0,02	82,8	12,7
Valtroxal	20	0,060	57824	14,6	56732	14,1	n.s.	98,1	12,4
	40	0,120	67804	10,5	52678	21,7	<0,01	77,7	14,1
	160[b.]	0,480	61201	10,4	54255	14,6	<0,05	88,7	6,4
K4	20	0,112	65634	18,5	61079	21,4	n.s.	93,1	7,3
	40	0,224	79508	6,7	73708	9,7	n.s.	92,7	4,0
	80	0,448	67962	21,9	55827	32,6	n.s.	82,1	10,5
K6	40	0,196	75435	11,8	68918	16,0	n.s.	91,4	7,3
	80	0,392	74448	11,0	62299	15,6	<0,02	83,7	7,3
	160[b.]	0,784	74214	11,4	66366	15,4	n.s.	89,4	9,8
NaCl 0,9%			67165	21,4	66889	21,9	n.s.	99,6	7,7
Tween 80®	25		76592	9,6	68018	18,2	n.s.	88,8	9,4

a. Signifikanzberechnung im Vergleich zu der motorischen Aktivität in den individuellen Kontrollnächten durch den einseitigen, ungepaarten t-Test nach Student (n.s. = nicht signifikant)

b. Zusatz von Tween 80® 25 mg/kg

c. Prüfung auf antagonistische Effektivität von K4 gegenüber Acetylcholin und Histamin

Die Prüfung wurde an isolierten, etwa 30 mm langen Segmenten der Ileumlongitudinalmuskulatur von männlichen Meerschweinchen durchgeführt. K4 antagonisierte weder die Wirkungen von Acetylcholin noch diejenige von Histamin (höchste geprüfte K4-Konzentration: 10^{-5} bzw. 10^{-4} Mol/l).

6. Allgemeine Diskussion und Besprechung

Durch das sich nach der Entdeckung der pharmakologischen Wirksamkeit der Valepotriate verstärkt dieser neuen Wirkstoffgruppe zuwendende Interesse wurde längere Zeit die Suche nach anderen Wirkstoffen des Baldrians vernachlässigt. Erst in neuerer Zeit wird auch wieder über eine mögliche Mitbeteiligung des ätherischen Öles an der Wirkung des Baldrians berichtet. Die Wirkung soll nach GSTIRNER und KIND (1951) sowie NOLLE (1929) zu einem Drittel auf das ätherische Öl zurückzuführen sein, während etwa zwei Drittel auf den Valepotriaten beruhen. HENDRIKS et al. (1981) berichteten über eine sedative Wirksamkeit der beiden Sesquiterpenderivate des ätherischen Öles von Valeriana officinalis L. Valerenal und Valerensäure im "Syndrometest" nach intraperitonealer Applikation bei Mäusen. Weiter berichteten HENDRIKS et al. (1982) auch über eine Hemmung der Motilität bei Ratten durch die intraperitoneale Applikation von zwei weiteren Inhaltsstoffen des ätherischen Öles. Dabei handelt es sich um die Acetoxyvalerensäure und Hydroxyvalerensäure. Als weiteren möglicherweise an der Wirkung mitbeteiligten Inhaltsstoff fanden HÄNSEL et al. (1981) in Baldriantinktur neben anderen Aminosäuren auch GABA, die eine Rolle als Neurotransmitter im ZNS spielt. Die Wirkstoff-Frage flüssiger Baldrianpräparate, wie beispielsweise gelagerter Baldriantinktur, die infolge ihrer Instabilität Valepotriate so gut wie nicht mehr enthält, ist aber, trotz der langen volksmedizinischen Erfahrung, nach Hänsel noch ungeklärt.

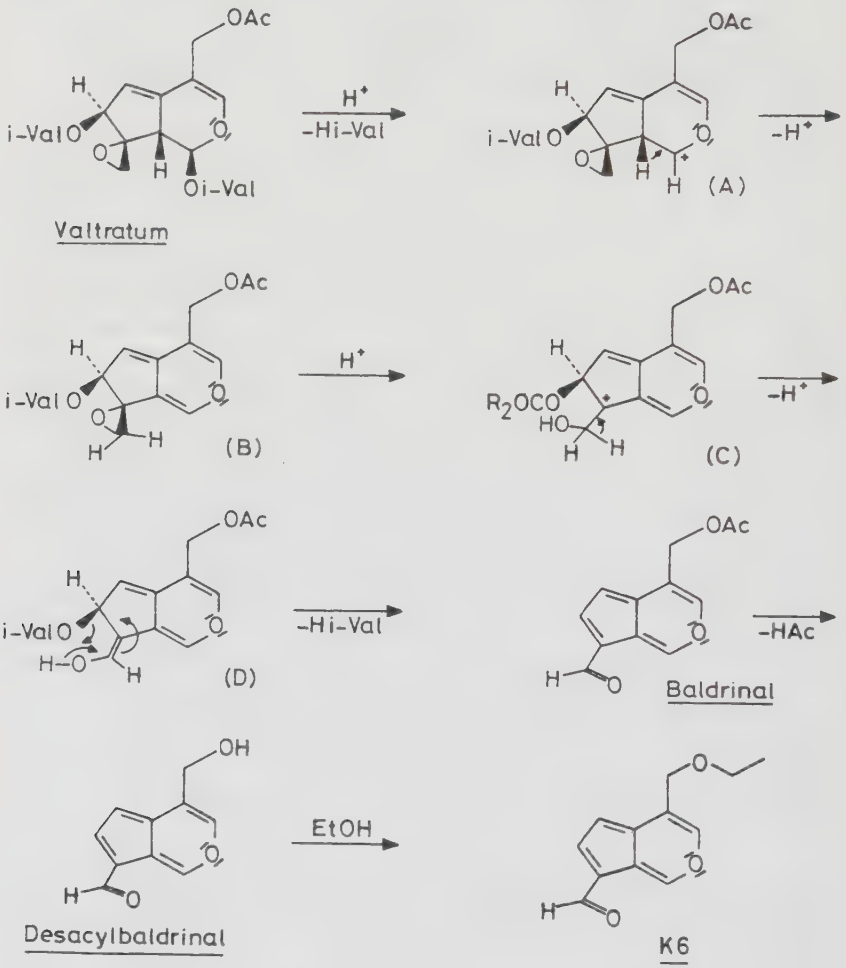
Wie eigene Untersuchungen zeigten, ließen sich aber auch die bereits eingangs erwähnten Abbauprodukte der Valepotriate, wie die Baldrinale und Valtroxal, die ebenfalls an der Wirkung des Baldrians mitbeteiligt sein könnten, DC nicht nachweisen. Nach SCHILD (1969) kann die Abnahme des Valtratgehalts in einer Tinktur derart gedeutet werden, daß sich die Valepotriate mit dem Lösungsmittel durch Hydrolyse und/oder Ethanolyse umsetzen.

Die im Vergleich zu Valeriana officinalis L. valepotriatrei-

chere Wurzel von Centranthus ruber DC. wurde für die Gewinnung möglicherweise in ethanolischer Lösung stabiler und pharmakologisch wirksamer Valepotriatartefakte herangezogen. Die aus der Wurzel gewonnenen neuen Abbauprodukte K4 und K6 konnten allerdings in der Baldriantinktur dc ebenfalls nicht nachgewiesen werden, und kommen somit als deren Wirkprinzip auch nicht in Frage.

Die Substanz K6 bildet sich mit Ethanol unter Rückfluß durch Thermoabbau von Dienvalepotriaten. Im Unterschied zu der von SCHILD (1969) angenommenen Umesterung mit dem Lösungsmittel bei Raumtemperatur, bei der neben Isovaleriansäure- und Essigsäureethylester desacylierte Valepotriate gebildet werden müßten, erfolgte bei der Bildung von K6 eine Etherbildung mit dem Lösungsmittel Ethanol. Die Bildung von K6, dem Ethylether des Desacylbaldrinals, dürfte in mehreren Schritten ablaufen, wobei die ersten Schritte bis zum Baldrinal vermutlich der von THIES (1969) für dessen Bildung aus Valtratum formulierten Bildung entsprechen dürften. Danach entsteht aus Valtratum (Abb. 49) im sauren Milieu unter Elimination der Isovaleriansäure an C-1 das Ion A. Dieses stabilisiert sich dann unter Elimination des Protons vom C-9 und Ausbildung einer Doppelbindung C-1,C-9 (B). Nach Öffnung des Epoxidrings unter Bildung des Ions C bildet sich als weiteres Zwischenprodukt das Enol D. Durch Elimination der an C-7 sitzenden Acyloxygruppe und eines Protons vom C-10 entsteht Baldrinal unter Ausbildung eines pseudoaromatischen Systems. Für das dazu erforderliche schwach saure Milieu sind zunächst die in der Wurzel vorhandenen Pflanzensäuren verantwortlich. Später läuft durch Freisetzung der Säuren aus den Valepotriaten ein autokatalytischer Prozeß ab. Aus Baldrinal bildet sich nach WILLEMS (1980) unter Spaltung des Esters Desacylbaldrinal.

Abb. 49: Möglicher Bildungsweg von K6 aus Valtratum



Aus Desacylbaldrinal dürfte unter saurer Katalyse mit dem Lösungsmittel Ethanol der Ethylether des Desacylbaldrinals - K6 - hervorgehen. Gegenüber der Synthese einfacher Ether wie z.B. Diethylether ist die Bildung des Allylethers energe-

tisch begünstigt, so daß dieser schon bei niedrigeren Temperaturen, wie beim Aufbau von K6, entstehen kann.

Zur Bestätigung der Bildung von K6 aus Dienvalepotriaten wurde ein aus den Wurzeln von Valeriana wallichii D.C. gewonnenes Gemisch aus Valtratum und Isovaltratum unter Ansäuerung mit Weinsäure mit Ethanol 96% unter Rückfluß gekocht. Dabei fiel, wie DC-Prüfungen mit verschiedenen Fließmitteln sowie die IR-Spektren ergaben, neben dem Hauptprodukt K6 auch Baldrinal und Desacylbaldrinal an.

Auch die Synthese von K6 aus Baldrinal und Desacylbaldrinal unter den gleichen Bedingungen wie beim Einsatz von Valtratum und Isovaltratum konnte DC nachgewiesen werden. Als Nebenprodukt bei der Umsetzung von Baldrinal entsteht auch Desacylbaldrinal.

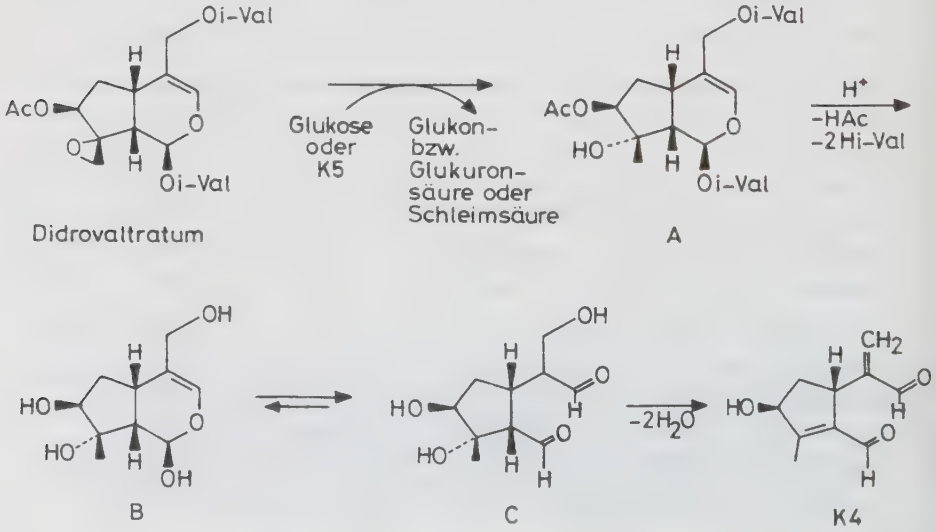
Der Aufbau homologer Alkylether, wie ein Methylether bzw. ein n-Propylether des Desacylbaldrinals, gelang unter Ansäuerung mit Weinsäure und Kochen unter Rückfluß eines Gemischs aus Valtratum und Isovaltratum mit Methanol bzw. n-Propanol nicht. Unter Verwendung von Methanol als Lösungsmittel bildeten sich nur Baldrinal, mit n-Propanol als Lösungsmittel nur Baldrinal, Desacylbaldrinal und Homobaldrinal. Die Bildung des Ethylethers K6 könnte daher auf die gegenüber den praktisch wasserfreien Lösungsmitteln Methanol und n-Propanol abweichenden Polarität des 96%igen Ethanols als Lösungsmittel zurückzuführen sein.

Das neue Abbauprodukt der Monoenvalepotriate - die Substanz K4 - tritt erst bei einer im Vergleich zur K6-Bildung höheren Temperatur auf (siedendes Toluol, 110° C). Dabei muß es zu einer Reduktion der Oxirangruppe der Monoenvalepotriate gekommen sein, wie ein Vergleich mit einem von THIES (1969) beschriebenen Dialdehyd zeigt (Abb. 7, S. 17), der sich von Monoenvalepotriaten durch Umsetzung mit Säuren bildet.

Wahrscheinlichstes Ausgangsprodukt für K4 ist Didrovaltratum. Als mögliches Reduktionsmittel kommt Glucose in Frage, da MANNETSTÄTTER et al. (1966) in den Wurzeln von Centranthus ruber DC. relativ viel Saccharose nachwiesen. Für die Spaltung in Invertzucker spricht der Nachweis des Fruktose-Abbauprodukts 5-Hydroxymethyl-furfural (K5). Die Glucose könnte

dann durch Didrovaltratum zu D-Gluconsäure oder D-Glucuronsäure oxidiert werden. Als Reduktionsmittel kommt aber auch 5-Hydroxymethyl-furfural in Frage, da diese Substanz leicht zu Schleimsäure oxidiert werden kann (BEYER und WALTER, 1981). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde Didrovaltratum mit Glucose und Fruktose unter Rückfluß mit Ethanol 96% gekocht. Nach dem Einengen zur Trockne wurde nach Zugabe einiger Tropfen Wasser unter Rückfluß mit Toluol gekocht. Dabei bildete sich K4 neben 5-Hydroxymethyl-furfural, wie DC-Untersuchungen mit verschiedenen Fließmitteln sowie die Hydrazonbildung mit dem Sprühreagenz DNPH bewiesen. Neben einer Vielzahl anderer Verbindungen wurde K4 allerdings unter diesen Bedingungen nur in ganz geringer Ausbeute erhalten, so daß den analytischen DC-Untersuchungen präparative DC-Trennungen vorangehen mußten. Wegen der geringen Ausbeute mußte auf eine Absicherung der Identität der Substanz K4 durch ein IR-Spektrum verzichtet werden. Das vermutliche Reaktionsschema von Didrovaltratum zum K4 (Abb. 50) läßt sich in Analogie zu dem von THIES (1969) bei der Bildung des in Abbildung 7 (S. 17) dargestellten Dialdehyds aufgestellten Schema wie folgt formulieren:

Abb. 50: Möglicher Bildungsweg der Substanz K4 aus Didrovaltratum



Der Reduktion des Didrovaltratums zu einem 8-Hydroxyderivat (A) folgt eine saure Hydrolyse der drei Estergruppen unter Bildung eines Polyalkohols (B). Nach Öffnung des Dihydropyranrings stabilisiert sich das Zwischenprodukt (C) unter Elimination von Wasser zu K4.

Denkbar wäre aber auch eine Bildung von K4 über die Verbindung 8,10-Desoxididrovaltratum. Bereits in der Wurzel von Centranthus ruber DC. könnte sich durch enzymatische Reduktion aus Didrovaltratum das 8,10-Desoxidodidrovaltratum bilden, welches THIES et al. (1973) bereits in sehr geringer Menge aus den Wurzeln von Valeriana wallichii DC. isolierte. Durch DC ließ sich allerdings das 8,10-Desoxidodidrovaltratum, dessen Rf-Wert bei Verwendung der Fließmittel Ether-Petrolether (85/15) und Toluol-Ethylacetat (83/17) jeweils etwas größer als der von Valtratum ist, in den Wurzeln von Centranthus ruber DC. nicht nachweisen.

Nach Anlagerung von Wasser im sauren Milieu an die Exomethylengruppe von 8,10-Desoxidodidrovaltratum könnte sich das Markownikow-Produkt A in Abbildung 50 bilden, das in K4 übergehen könnte. Der Aufbau eines Markownikow-Produkts bei der Addition von Wasser im sauren Milieu an eine unsymmetrisch substituierte Doppelbindung wie hier ist deshalb bevorzugt, weil sich hierbei im ersten Schritt - der Addition eines Protons - ein stabileres tertiäres Carbeniumion (C-8) ausbilden kann. An das Carbeniumion lagert sich Wasser an, gefolgt von der Elimination eines Protons und der Bildung eines tertiären Alkohols. Eine experimentelle Überprüfung dieser Hypothese analog der K4-Synthese aus Didrovaltratum mit authentischem 8,10-Desoxidodidrovaltratum als Ausgangsprodukt mißlang allerdings.

Ebenso denkbar wäre auch eine Bildung von K4 aus Valerosidatum, dessen Vorkommen in Centranthus ruber DC. allerdings ebenfalls noch nicht beschrieben wurde. Nach Hydrolyse der Ester und der glykosidischen Bindung würde der Polyalkohol B (Abb. 50) entstehen.

Von großem Interesse war es, die pharmakologischen Eigenschaften der Abbauprodukte der Valepotriate kennen zu lernen,

da diesen die für die cytotoxischen Nebenwirkungen der Valepotriate vor allem verantwortliche Epoxidgruppe fehlt.

Im Gegensatz zu der spasmolytischen Aktivität der Valepotriate (WAGNER, JURCIC, 1979) konnte dieser Effekt bei dem Abbauprodukt K4 nicht beobachtet werden. Weder der durch Acetylcholin noch der durch Histamin induzierte Spasmus am isolierten Meerschweinchenileum ließ sich beeinflussen. Die gleiche Beobachtung machte auch WILLEMS (1980) bei Valtroxal, Baldrinal und Desacylbaldrinal.

Beim Vergleich der akuten Toxizitäten ergab sich für K6 mit 1,87 mMol/kg bei intraperitonealer Gabe im Vergleich zum genuinen Ausgangsprodukt Valtratum mit 0,15 mMol/kg eine geringere LD_{50}. Auch K4 erwies sich bei intraperitonealer, nicht aber bei peroraler, Applikation mit 0,39 mMol/kg bzw. 1,51 mMol/kg als untoxischer im Vergleich zu Didrovaltratum mit einer LD_{50} von 0,29 mMol/kg bzw. > 10,85 mMol/kg. Die hohe perorale Toxizität von K4 könnte auf eine trotz seines kleinen Verteilungskoeffizienten gute Resorption bzw. auf die Bildung eines toxischen Metaboliten hindeuten.

Wie bereits eingangs erwähnt, fallen beim Vergleich der bei der Prüfung auf Beeinflussung der Spontanmotilität bei Mäusen bisher publizierten Arbeiten neben der in der Regel nicht nachgewiesenen Dosisabhängigkeit der Testsubstanzen, bei den angewendeten Methoden besonders die unterschiedlichen Angaben über den Zeitpunkt des Versuchsbeginns und die Versuchsdauer auf. Bis auf die Arbeit von FINK (1982) wird dabei der natürliche 24-Stunden-Rhythmus der kleinen Nager nicht berücksichtigt, so daß ein Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeiten sehr erschwert wird. Die bekanntlich nachtaktiven Mäuse (ASCHOFF, 1963) haben ihr Motilitätsmaximum während der Nacht, so daß sinnvollerweise während dieses Zeitraums die Beeinflussung der Motilität durch potentiell sedierende Substanzen getestet wird. Zur optimalen Standardisierung der Versuchsbedingungen wurden die Tiere durch einen Wechsel von Licht und Dunkel synchronisiert. Andere Synchronisationsfaktoren, die die Motilität der Tiere beeinflussen könnten (z.B. Nahrungszufuhr), wurden nicht verwendet. Die Versuche wurden in einem störungs-

freien Meßraum mit gleichbleibender Temperatur durchgeführt, in dem den Tieren Wasser und Futter ad libitum zur Verfügung standen. Da Untersuchungszeiten bis zu etwa zwei Stunden als zu kurz erschienen, wurde die Beeinflussung der Motilität während der ganzen nächtlichen Aktivitätsperiode der Mäuse erfaßt.

Aufgrund individueller Motilitätsschwankungen (vgl. Abb. 32, S. 49) konnte trotz Verwendung von männlichen Mäusen desselben Stammes und etwa gleichen Gewichts sowie Alters auf eine Eigenkontrolle durch die Aktivitätsmessung bei denselben Mäusen am vorangehenden Kontrolltag nicht verzichtet werden.

Die sich in den Abbildungen der prozentualen motorischen Aktivität durch relativ große Standardabweichungen zeigenden Motilitätsoszillationen der NMRI-Mäuse dürfte in Analogie zu von LEMMER et al. (1981) mit Ratten durchgeführten Untersuchungen eine charakteristische Eigenschaft dieses Stammes sein. Wie vergleichende Untersuchungen von sechs Rattenstämmen zeigten, die unter den gleichen Licht-Dunkel-Verhältnissen und mit demselben Zwei-Kanal-Animex-Motimeter wie die eigenen Versuche durchgeführt wurden, bestehen zwischen diesen signifikante Unterschiede bei der circadianen motorischen Aktivität. Diese Unterschiede bestehen sowohl bei der gesamten motorischen Aktivität als auch bei der hauptsächlich die Laufmotilität darstellenden Aktivität. Relativ geringe Schwankungen der Motilität, verglichen mit den Standardabweichungen der NMRI-Mäuse, weisen männliche WISTAR-Ratten auf (LEMMER und BERGER, 1978). Aufgrund des etwa nur ein Fünftel des Körpergewichts von Ratten betragenden Gewichts von Mäusen und des damit zusammenhängenden geringeren Bedarfs an Testsubstanzen wurden für die Untersuchungen trotzdem Mäuse herangezogen. Erwartet wurde dabei auch eine bessere Vergleichbarkeit mit den bisher in der Literatur nur mit Mäusen durchgeführten Versuchen zur Beeinflussung der Spontanmotilität durch Valepotriate und deren Artefakte.

Der direkte Vergleich der prozentualen Motilitätskurven nach Gabe verschiedener Dosen einer Testsubstanz sowie der Substanzen untereinander wurde durch die Motilitätsoszillationen

erheblich gestört, da oft, insbesondere nach peroraler Gabe, eine Unterscheidung zwischen wirkstoffbedingten Motilitätsänderungen und zufälligen Oszillationen nicht möglich war. Zur deutlicheren Ermittlung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurden daher die jeweiligen (halb)stündlichen Motilitätsimpulse kumulativ über einen längeren Zeitraum addiert, da hierbei die in der Regel ein bis zwei Stunden andauernden Oszillationen ausgeglichen werden. Als Kumulationszeitraum wurden zehn Stunden gewählt, da am Ende der Nachtperiode ein starker Abfall der motorischen Aktivität bei unbehandelten Mäusen zu beobachten war (Abb. 32, S. 49). Durch dieses Verfahren konnten aber auch kürzer wirkende Substanzen erfaßt werden, sofern deren Wirkung nicht durch Hypermotilitäten während des Kumulationszeitraums völlig kompensiert wurde. Dies war aber bei den untersuchten Substanzen nicht der Fall. Zum Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehungen der untersuchten Substanzen wurden diese durchschnittlichen, prozentualen, motorischen Aktivitäten in ein Wahrscheinlichkeitsnetz eingetragen.

Die sich aus den Wahrscheinlichkeitsnetzen ergebenden ED_{50}-Werte in Bezug auf die motorische Aktivität ermöglichen einen Wirksamkeitsvergleich der Abbauprodukte mit dem genuinen Didrovaltratum. Danach ist Didrovaltratum bezogen auf mMol/kg nach intraperitonealer Applikation weniger wirksam als die Abbauprodukte Valtroxal und K4, aber wirksamer als K6 und Baldrinal. Die wirksamste der getesteten Substanzen bezogen auf mMol/kg ist Valtroxal, während die hydrophilste Substanz, K4, die zweitwirksamste Verbindung ist. Eine Korrelation zwischen diesen ED_{50}-Werten und den Verteilungskoeffizienten der untersuchten Substanzen ließ sich nicht erkennen.

Bei einem Vergleich der Steigungen der Regressionsgeraden in den Wahrscheinlichkeitsnetzen der Abbildungen 41 und 42 (S. 61) fällt auf, daß sowohl bezogen auf mMol/kg als auch auf mg/kg die Gerade von K6 die größte Steigung aufweist, während die anderen Geraden bei fast parallelem Verlauf eine geringere Steigung aufweisen. Diese größere Steigung der Regressionsgeraden von K6 weist auf einen kleineren Dosisbereich zwischen Wirkungseintritt und maximaler Wirkung hin, wobei die Ursache noch ungeklärt ist.

Bei den Versuchen zur Hemmung der Spontanmotilität ist zu berücksichtigen, daß diese auch durch toxische Effekte beeinflußbar ist. Um diese unerwünschten Effekte möglichst auszuschließen, wurde die Obergrenze der maximalen Testdosierungen bei < 30% der LD_{50} gezogen.

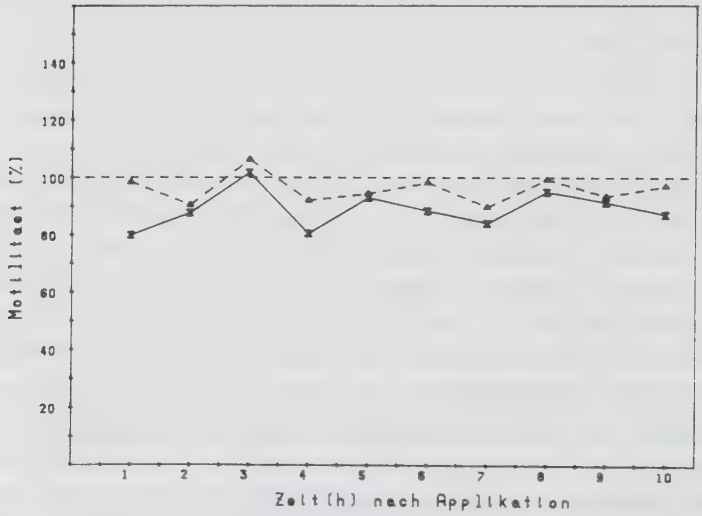
Unter Zugrundelegung der durch Kumulation über 10 Stunden nach intraperitonealer Applikation der Testsubstanzen berechneten ED_{50}-Werte in Bezug auf die motorische Aktivität zeigt K6 die größte und Didrovaltratum die geringste therapeutische Breite. Bei dieser Feststellung ist aber zu berücksichtigen, daß auch die Toxizität vom Applikationszeitpunkt abhängig ist. So schwankt z.B. nach v. MAYERSBACH (1976) die Mortalitätsrate bei einer Dosis von 190 mg/kg Phenobarbital bei licht-dunkel-synchronisierten Ratten zwischen 0% in der Mitte der Aktivitätsperiode und 100% am Ende der Ruheperiode der Versuchstiere. Da die akute Toxizität, wie allgemein üblich, am Tag ermittelt wird, sind auf der Basis der ermittelten ED_{50}-Werte in Bezug auf die motorische Aktivität und den in der Literatur genannten Toxizitäten zuverlässige Berechnungen über die therapeutischen Breiten der einzelnen Substanzen schwer möglich.

Im Unterschied zur intraperitonealen Applikation ließ sich bei peroraler Applikation im allgemeinen nur eine mäßige Verminderung der motorischen Aktivität nachweisen. Dies gilt auch dann, wenn man den länger andauernden Applikationseffekt in Form einer Hypermotilität nach peroraler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung berücksichtigt (Abb. 43, S. 63). Obwohl höhere Dosen bei allen Substanzen Verminderungen der motorischen Aktivität zur Folge hatten, erwiesen sie sich nur in schwacher, nicht signifikanter Ausprägung als dosisabhängig, wie die Tabelle 12 (S. 70) zeigt.

Als störend bei der Ermittlung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen erwies sich die Verwendung des Hilfsstoffs Tween 80®, der sich in Vorversuchen im Vergleich zu anderen Hilfsstoffen wie PÄG und Cellulosederivaten als technologisch optimal erwies, und deshalb bei einigen höheren Substanzdosen zugegeben wurde. Im Gegensatz zu den vergleichsweise niedrigeren intraperitonealen Dosen konnte zur Herstellung einer oral applizier-

baren Lösung bzw. Suspension nicht auf einen Hilfsstoffzusatz verzichtet werden. Bereits in Vorversuchen stellte sich heraus, daß Emulgatoren wie Tween 80 und insbesondere Lecithin bei i.p. Anwendung die motorische Aktivität herabsetzen. Auch eine daraufhin durchgeführte Untersuchung mit oral appliziertem Tween 80® ergab bereits nach einer Stunde eine Verminderung der Motilität auf 79,9% im Vergleich zur Kontrollnacht (Abb. 51). Die Kumulation der Motilitätsimpulse ergab, wie aus der Tabelle 12 hervorgeht, ebenfalls eine - allerdings nicht signifikante - Verminderung der Motilität auf 88,8%. Das beobachtete Ansteigen der motorischen Aktivität durch die jeweils höchsten Valtroxal- und K6-Dosen dürfte nicht allein auf den Hilfsstoff zurückzuführen sein. Dies

Abb. 51: Veränderungen der durchschnittlichen motorischen Aktivität über jeweils 60 Minuten in Prozent gegenüber der Kontrollnacht (= 100%) in Abhängigkeit von der Zeit nach p.o. Applikation von Tween 80® im Vergleich zu unbehandelten Mäusen



unbehandelte Mäuse --▲--
Tween 80® 25 mg/kg —▼—

n = 5

wurde noch bestätigt durch die größte Baldrinal-Dosis, bei der ebenfalls Tween 80® als Hilfsstoff verwendet werden mußte. Hier war ein derartiger Effekt nicht zu beobachten.

Als Ursachen für die meist schwachen, nicht signifikanten Verminderungen der motorischen Aktivität nach peroraler Applikation gegenüber den Wirkungen nach intraperitonealer Gabe kommt, neben schlechter Resorption der Substanzen mit relativ kleinen Verteilungskoeffizienten, insbesondere die mangelnde Stabilität im Magen-Darm-Trakt in Frage. Wie bereits früher erwähnt, wird Didrovaltratum nach Untersuchungen von WAGNER und JURCIC (1980) bereits im Magen und Darm zu einem großen Teil abgebaut, so daß nur noch wenig intakte Substanz in den einzelnen Organen nachgewiesen werden kann. Aber auch bei den untersuchten Valepotriatabbauprodukten ist, wie eigene in vitro Untersuchungen sowie Untersuchungen von WILLEMS (1980) zeigten, mit einer Instabilität der allgemein als reaktionsfreudig geltenden αß-ungesättigten Aldehydverbindungen zu rechnen. In Frage kommt aber auch eine irreversible Bindung an Futterbestandteile. WAGNER und JURCIC (1980) nehmen diesen Effekt mit hoher Wahrscheinlichkeit für Didrovaltratum an, da sich 3,5 Stunden nach peroraler Applikation bei Mäusen noch die Hauptmenge an Didrovaltratum im Magen befand.

Wie die pharmakologischen Versuche zeigten, besitzen neben Didrovaltratum auch die Abbauprodukte der Valepotriate sedierende Eigenschaften, wobei sich nach intraperitonealer Applikation erstmals signifikante, dosisabhängige Hemmungen der motorischen Aktivität zeigten. Voraussetzung war dabei, wie die Vorversuche zeigten, die Verwendung Licht-Dunkel-synchronisierter Mäuse und die Testung der Substanzen in der Aktivitätsperiode der Tiere. Für die Motilitätshemmung sind offensichtlich weder der intakte Epoxidring noch die Esterfunktionen essentiell. An der Wirkung mitbeteiligt könnte dagegen die Aldehydgruppe sein, worauf die Tatsache hinweist, daß K4 als wirksamste Verbindung einen Dialdehyd darstellt.

Noch offen ist die Frage, worauf die offensichtlich geringe Bioverfügbarkeit der getesteten Abbauprodukte oder deren wirksame Metabolite nach oraler Gabe beruht, wie ein Vergleich

mit der nach i.p. Applikation viel stärkeren Wirksamkeit nahelegt. Die Bindung an Futterbestandteile ließe sich möglicherweise durch Testung mit nüchtern gehaltenen Tieren ausschließen. Signifikante Motilitätsänderungen sind dabei innerhalb der ersten 24 Stunden nach Nahrungsentzug nicht festzustellen, wie LEMMER und BERGER (1978) bei Ratten zeigten. Diese sind aber nicht auszuschließen, wenn zur völligen Verdauung störender Nahrungsreste eventuell längere Zeiten erforderlich sind. Denn nach Untersuchungen von FINK (1982) finden sich noch 24 Stunden nach Nahrungsentzug unterschiedliche Futtermengen im Magen von Mäusen.

Ungeklärt ist auch noch auf welchen biochemischen Reaktionen die Wirkungen der getesteten Substanzen beruhen. Aufschluß darüber könnten vor allem pharmakokinetische Untersuchungen sowie Untersuchungen der im Gehirn von Versuchstieren auffindbaren Substanzen - genuine Verbindungen bzw. Metabolite - erbringen.

7. Zusammenfassung

a. Eine gemeinsame Eigenschaft aller Valepotriate ist ihre relative Instabilität gegenüber Säuren, Laugen und höheren Temperaturen. Durch Thermo-Abbau bildet sich bei Soxhlet-Extraktion der Wurzel von Centranthus ruber DC. mit Ethanol aus Valepotriaten die Substanz K6. Daneben ist das Zucker-abbauprodukt 5-Hydroxymethyl-furfural (K5) nachweisbar. Bei Siede-Temperatur des Toluols (110^{o}) bildet sich aus dem eingeengten Ethanol-Extrakt durch Extraktion im Perforator die Substanz K4.

b. K6 ist ein Abbauprodukt von Dienvalepotriaten. Dies wurde durch Darstellung aus einem Gemisch von Valtratum als Hauptbestandteil und Isovaltratum bewiesen. Die Struktur der Substanz wurde mit spektroskopischen Methoden (UV, IR, MS, ^{1}H-NMR) sowie über die Bildung eines 2,4-Dinitrophenylhydrazons aufgeklärt. Es handelt sich um den Ethylether des Desacylbaldrinals. Die Ausbeute an K6 aus der getrockneten Ausgangsdroge betrug etwa 0,005%.

c. K6 läßt sich im weinsauren, ethanolischen Milieu unter Rückfluß auch aus Baldrinal und Desacylbaldrinal in geringer Ausbeute herstellen.

d. K5, das 5-Hydroxymethyl-furfural, ist ein Abbauprodukt von Fruktose. Die Struktur wurde mit spektroskopischen Methoden (UV, IR, MS, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR) aufgeklärt und mit Referenzsubstanz bestätigt. Die Ausbeute an K5 aus der getrockneten Ausgangsdroge betrug etwa 0,01%.

e. Die Substanz K4 ist ein Abbauprodukt von Monoenvalepotriaten. Dies wurde durch Darstellung aus Didrovaltratum durch DC und Sprühreagenzien nachgewiesen. Die Struktur wurde mit spektroskopischen Methoden (UV, IR, MS, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR) aufgeklärt. Es handelt sich um (3S,5R)-5-(1-Formylvinyl)-3-hydroxy-2-methyl-1-cyclopenten-carbaldehyd. Die Ausbeute an K4 aus der getrockneten Ausgangsdroge betrug etwa 0,05%.

f. Gegenüber Säuren und Laugen sind K4 und K6 nicht stabil. Bei pH-Werten < 4 und > 8 treten in Lösung braungefärbte Verbindungen auf.

g. Die Wasserlöslichkeit von K6 ist mit 0,15% sehr gering. K4 ist mit 5,4% hingegen weitaus besser wasserlöslich.

h. Entsprechend den Verteilungskoeffizienten zeigen die pharmakologisch getesteten Substanzen folgende Reihenfolge in ihrer Lipophilie:

Didrovaltratum > Baldrinal > K6 > Valtroxal > K4

i. Die an Mäusen getestete akute Toxizität von K6 ist nach intraperitonealer Applikation geringer als die des Valtratums (1,87 bzw. 0,15 mMol/kg). Bei K4 ist sie nach i.p. Applikation mit 0,39 mMol/kg geringer als die der Ausgangssubstanz Didrovaltratum mit 0,29 mMol/kg; nach p.o. Gabe aber mit 1,51 gegenüber > 10,85 mMol/kg deutlich höher. Die Reihenfolge der halbmaximalen Toxizitäten der getesteten Substanzen auf molarer Basis nach i.p. Applikation ist folgende:

Valtroxal	> Didrovaltratum	> K4	> K6	> Baldrinal
(0,25)	(0,29)	(0,39)	(1,87)	(2,13)

j. Weder der durch Acetylcholin noch der durch Histamin induzierte Spasmus der isolierten Ileumlongitudinalmuskulatur des Meerschweinchens ließ sich durch die Substanz K4 antagonisieren.

k. Baldrinal, Valtroxal, K4 und K6 im Vergleich zu Didrovaltratum wurden an licht-dunkel-synchronisierten Mäusen auf Beeinflussung der motorischen Aktivität getestet. Die Applikation erfolgte zu Beginn der Nacht. Die Kumulation der Meßimpulse über einen Zeitraum von 10 Stunden ermöglicht ein besseres Erkennen von Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Die Verwendung von Wahrscheinlichkeitsnetzen erlaubt einen Wirksamkeitsvergleich der Testsubstanzen durch die ED_{50}-Werte.

Nach i.p. Applikation wurde die motorische Aktivität durch alle getesteten Substanzen dosisabhängig gehemmt. Dabei ergibt sich folgende Wirksamkeitsreihenfolge:

mMol/kg: Valtroxal > K4 > Didrovaltratum > K6 > Baldrinal
(0,058) (0,70) (0,093) (0,176) (0,385)

mg/kg: K4 > Valtroxal > K6 > Didrovaltratum > Baldrinal
(12,5) (19,4) (35,9) (39,7) (84,1)

Auch nach p.o. Applikation ließen sich bei allen Substanzen Verminderungen der motorischen Aktivität nachweisen. Diese sind nur in schwacher, nicht signifikanter Ausprägung dosisabhängig, so daß ein Wirksamkeitsvergleich nicht sinnvoll ist.

1. Wie die durchgeführten Untersuchungen zeigen, sind weder der intakte Epoxidring noch die Estergruppen der Valepotriate für die Wirkung der Substanzen essentiell. Dagegen könnte an der Wirkung die Aldehydgruppe mitbeteiligt sein, worauf die Tatsache hinweist, daß es sich bei der wirksamsten Verbindung K4 um einen Dialdehyd handelt.

IV. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Chromatographische Methoden

a. Dünnschichtchromatographie

Die DC-Untersuchungen wurden mit Kieselgel 60 F_{254} Fertigplatten (Fa. Merck) durchgeführt. Die Platten wurden in gesättigten Kammern bei Raumtemperatur entwickelt, wobei die Laufstrecke in der Regel 10 cm betrug.

b. Fließmittel für die Trennung der Valepotriate und deren Abbauprodukte

A) n-Hexan-Butanon-(2) (80/20)
B) Toluol-Ethylacetat (83/17)
C) Toluol-Ethanol (80/20)
D) Ether-Petrolether (85/15)
E) Ether
F) Ethylacetat

c. Detektionsmittel

α) UV 254 nm

ß) DNPH-Eisessig-Salzsäure

In einer Mischung von 40 ml Eisessig, 40 ml Salzsäure (25%) und 20 ml Methanol werden 0,2 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin gelöst. Nach Besprühen werden die gefärbten Flecke bei Raumtemperatur bzw. nach Erwärmen (5 min bei 105° C) ausgewertet).

γ) NBP-Triethylamin-Aceton (modifiziert nach BRAUN et al., 1982)

Nach dem Besprühen mit einer Lösung von 3% 4-(4'-Nitrobenzyl-)pyridin in Aceton werden die Platten 5 Minuten auf 110° C erwärmt. Nach dem Abkühlen wird mit einer Lösung von 20% Triethanolamin in Aceton gesprüht, und sofort danach werden die relativ instabilen Anfärbungen ausgewertet.

d. Säulenchromatographie

Für die SC-Trennungen der Valepotriate wurden 150 g saures Aluminiumoxid mit einer Aktivität von II verwendet. Das Adsorbens wurde aus basischem Aluminiumoxid durch Versetzen mit 200 ml eines Gemischs aus Petrolether und Essigsäure (98/2) hergestellt. Das abgekühlte Gemisch wurde dann in eine gekühlte SC-Säule eingefüllt und mit Petrolether bis zur neutralen Reaktion perkoliert. Die Kontrolle erfolgte mit angefeuchtetem Indikatorpapier.

Für die SC-Trennungen der Abbauprodukte wurde Kieselgel 60 (Fa. Merck) mit einer Korngröße von 0,063 - 0,200 mm verwendet.

Die Füllung der Säule erfolgte jeweils durch Einschlämmen der stationären Phase im Elutionsmittel. Nach dem Absetzen wurde das Fließmittel bis auf einen Überstand von etwa zwei Millimeter abgelassen. Danach wurde bei geöffnetem Hahn die konzentrierte Rohextraktlösung (etwa 1:1 im Elutionsmittel gelöst) mit einer Pipette gleichmäßig über dem Überstand verteilt. Das Elutionsmittel wurde dann erst nach dem, bis auf einen Überstand von etwa zwei Millimetern, fast vollständigen Einziehen des Rohextrakts in die stationäre Phase nachgefüllt.

2. Herkunft, Trocknung und Lagerung der untersuchten Droge

Centranthus ruber DC. wurde im Botanischen Garten der Universität Frankfurt am Main in drei aufeinanderfolgenden Jahren (1980-82) angebaut, da die Wurzeldroge im Handel nicht erhältlich ist. Im Winter wurden aus Samen Setzlinge gezogen, welche im Frühjahr ausgepflanzt wurden. Die Ernte fand jeweils Ende Oktober, Anfang November statt. Nach dem Ausgraben der Wurzelstöcke wurden diese gewaschen und nach dem Abtropfen gewogen. Im Durchschnitt wurden 9 kg Frischdroge geerntet. Die einjährigen Wurzeln hatten ein Durchschnittsgewicht von 90 g. Die Wurzeln und Rhizome wurden in 5 cm lange Stücke geschnitten und danach in einem Umlufttrockenschrank bei 40° C

getrocknet. Der Trocknungsverlust betrug dabei etwa 80%. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die Droge in Weithalsgläsern in einer Tiefkühltruhe bei -18° C aufbewahrt.

3. Isolierung der Valepotriate

a. Isolierung von Valtratum, Isovaltratum und Didrovaltratum

Als Ausgangsdroge diente Valeriana wallichii DC. (Fa. Müggen, burg, Hamburg). Die Wurzeldroge wurde mit einer RETSCH-Schlagprallmühle mit einem Siebdurchmesser von 2 mm pulverisiert, und nach einer modifizierten Vorschrift von STAHL und SCHILD (1981) extrahiert. Dazu wurden 100 g der Wurzeldroge 24 Stunden lang mit 250 ml Dichlormethan mazeriert. Danach wurde die Droge in einem Perkolationsrohr mit 300 ml Dichlormethan extrahiert. Das Lösungsmittel wurde dann unter Vakuum bei 40° C mit einem Rotationsverdampfer abdestilliert. Der ölige Extrakt wurde dann mit einer SC-Kühlsäule aufgetrennt. Als Fließmittel wurde ein Gemisch von 800 ml Petrolether-Butanon-(2) verwendet, dessen Zusammensetzung pro 100 ml von 2,5% Butanon-(2), in Stufen von 2,5% ansteigend bis zu 20% Butanon-(2) gradientförmig verändert wurde. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler gesammelt.

Die Valtratum und Isovaltratum enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, und nach dem Einengen unter Vakuum durch präparative DC mit den Fließmitteln B und D gereinigt. Da Valtratum keine Kristalle bildet, war eine weitere Reinigung durch Umkristallisation nicht möglich, wobei in Kauf genommen werden mußte, daß eine Auftrennung der erhaltenen Mengen 450 mg Valtratum und Isovaltratum durch präparative DC nicht möglich war (Ausbeute bezogen auf die getrocknete Droge: etwa 0,5%).

Die Didrovaltratum enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und nach dem Einengen unter Vakuum in 5 ml Petrolether aufgenommen. Die aus der - über Nacht in einer Kühltruhe bei -18° C aufbewahrten - Lösung ausgefallenen Kristalle wurden dann

mehrfach mit Petrolether umkristallisiert (Ausbeute: 90 mg, bezogen auf die getrocknete Droge: 0,09%).

Säulendurchmesser	:	15 mm
Säulenlänge	:	1000 mm
Tropfgeschwindigkeit:		50 Tropfen/min
Größe der Fraktionen:		ca. 20 ml

b. Herstellung des Dichlormethanextrakts von Centranthus ruber DC.

Die noch tiefgefrorene Droge wurde mit einer RETSCH-Schlagprallmühle mit einem Siebdurchmesser von 2 mm zerkleinert. 10 g Drogenpulver wurde mit 50 ml Dichlormethan versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur mazeriert. Anschließend erfolgte eine dreimalige je drei Minuten dauernde Extraktion mit einem Ultraturrax unter Verwendung von jeweils 50 ml Dichlormethan. Der Dichlormethanextrakt wurde dann in einer Kühlzentrifuge (Cryofuge, Fa. Heraeus) zentrifugiert und im Vakuum bei 40° C auf etwa 1 ml eingeengt. Der eingeengte Dichlormethanextrakt wurde für DC-Untersuchungen verwendet.

c. Herstellung der Tinktur von Centranthus ruber DC.

Die Tinktur wurde nach der Vorschrift des DAB 8 für Baldriantinktur mit 30 g Wurzelpulver von Centranthus ruber DC. hergestellt (Ethanol 70%; Perkolation). Die frische Tinktur wurde dc untersucht.

4. Bildung und Isolierung der Abbauprodukte

a. Bildung des Valtratum-Abbauproduktes K6 und des Fruktose-abbauproduktes 5-Hydroxymethyl-furfural (K5)

150 g Drogenpulver von Centranthus ruber DC. wurden in einem Soxhlet-Extraktionsgerät so lange mit Ethanol (96%) extrahiert (ca. 48 Std.) bis dc keine Valepotriate mehr nachweisbar waren. Der unter Vakuum eingeengte Rohextrakt wurde dc untersucht und anschließend durch SC aufgetrennt.

b. Säulenchromatographische Auftrennung des ethanolischen Soxhletextrakts

Die Vorbereitung der Säule erfolgte wie unter Punkt 1.d beschrieben.

Säulendurchmesser	:	45 mm
Säulenlänge	:	700 mm
Kieselgel 60	:	400 g
Tropfgeschwindigkeit	:	30 Tropfen/min
Größe der Fraktionen	:	ca. 20 ml
Elutionsmittel	:	Ether-Petrolether (85/15)

Dabei wurde K6 vor dem 5-Hydroxymethyl-furfural eluiert. Die die entsprechenden Substanzen enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und unter Vakuum eingeengt.

c. Isolierung der Substanz K6

Die K6 enthaltende Fraktion wurde in Ether aufgelöst und zur präparativen DC auf Kieselgel G Platten aufgetragen. Als Fließmittel wurde zuerst Toluol-Ethanol (80/20) und danach Ethylacetat verwendet. Zur Optimierung der Trennung wurde jeweils 2-3mal entwickelt. Die Elution von K6 aus den abgeschabten Kieselgelbanden erfolgte jeweils mit Ether. Die dc-reine Substanz wurde danach in 5 ml Ether gelöst und mehrere Tage in der Tiefkühltruhe bei -18° C aufbewahrt. Die dabei ausgefallenen Kristalle wurden aus Ether-Petrolether umkri-

stallisiert. Dabei wurden 8 mg gelbbraune Kristalle erhalten (Ausbeute bezogen auf die getrocknete Droge: etwa 0,005%).

d. Isolierung von 5-Hydroxymethyl-furfural (K5)

Das 5-Hydroxymethyl-furfural wurde in gleicher Weise wie in Punkt 4.c beschrieben isoliert. Dabei wurden 15 mg gelbbraune Kristalle erhalten (Ausbeute bezogen auf die getrocknete Droge: etwa 0,01%).

e. Bildung des Abbauprodukts K4

Der lösungsmittelfreie Soxhlet-Extrakt von 150 g Droge wurde mit 250 ml Wasser versetzt und dann 2-3 Tage mit insgesamt 300 ml Toluol in einem Perforator extrahiert. Anschließend wurde der Toluol-Extrakt unter Vakuum eingeengt und der Rückstand in Ether gelöst. Die Etherphase wurde mehrfach mit Wasser ausgeschüttelt (ca. 10mal), wobei die Phasentrennung durch Zentrifugation beschleunigt wurde. Die direkte Ausschüttelung der Toluol-Phase führte im Vergleich zu Ether zu noch schlechteren Phasentrennungen und wurde daher nicht angewendet. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden mit einem Rotationsverdampfer unter Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand in Ether aufgenommen.

f. Säulenchromatographische Auftrennung des hydrophilen Anteils des Toluol-Extrakts

Die Vorbereitung und Durchführung der SC-Auftrennung erfolgte wie bei 1.d für die SC-Trennung der Abbauprodukte (Säulendaten: 4.b) beschrieben. Die K4 enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und unter Vakuum eingeengt.

h. Isolierung der Substanz K4

Die K4 enthaltende Fraktion wurde in Ether aufgelöst und zur präparativen DC auf Kieselgel G Platten aufgetragen. Als

Fließmittel wurde zuerst Ether-Petrolether (85/15) und dann Toluol-Ethanol (80/20) verwendet, wobei jeweils 2-3mal entwickelt wurde. Die Endreinigung erfolgte durch Mehrfachentwicklung mit Ether als Fließmittel. Nach Auflösung der dc-reinen Substanz in einem Milliliter Ether schieden sich nach mehrtägiger Aufbewahrung in der Tiefkühltruhe bei -18° C Kristalle aus. Die Umkristallisation aus Ether-Petrolether ergab 70 mg hellgelbe Kristalle (Ausbeute bezogen auf die getrocknete Droge: etwa 0,05%).

i. Bildung von K6 aus Valtratum und Isovaltratum

10 mg des nach 3.a gewonnenen Gemisches von Valtratum und Isovaltratum wurden mit 1 mg Weinsäure versetzt und unter Rückfluß mit 10 ml Ethanol 96% gekocht. Nach 24 Stunden wurde das Gemisch unter Vakuum eingeengt und dc untersucht.

j. Bildung von K4 aus Didrovaltratum

100 mg Didrovaltratum wurden mit 300 mg Glucose und 300 mg Fructose sowie 5 mg Weinsäure 48 Stunden lang unter Rückfluß mit 15 ml Ethanol 96% gekocht. Nach Entfernung des Ethanols unter Vakuum wurde die Mischung unter Zusatz einiger Tropfen Wasser mit 15 ml Toluol erneut drei Tage lang unter Rückfluß gekocht. Nach der Entfernung des Toluols unter Vakuum wurde der Rückstand in Ether aufgenommen. Nach DC-Kontrolle mit den Fließmitteln B und D erfolgte die Reinigung mit Kieselgel G Platten durch präparative DC. Verwendet wurde zuerst zweimal das Fließmittel D, dann Ethylacetat. Jede Platte wurde jeweils dreimal entwickelt. Ausgeschabt wurde jeweils die der Vergleichssubstanz K4 entsprechende Bande. Die Elution des Kieselgels erfolgte jeweils mit Ether. Die der präparativen DC folgende analytische DC wurde mit den Fließmitteln A, B, C und D sowie Ether und Ethylacetat durchgeführt.

5. Darstellung des 2,4-Dinitrophenylhydrazons von K6

a. Herstellung der Reagenzlösung (modifiziert nach WINTERFELD, 1971)

5 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin werden in 60 ml Phosphorsäure (85%) auf dem Wasserbad gelöst. Die Lösung wird mit 40 ml Ethanol (96%) verdünnt.

b. Durchführung der Reaktion

Etwa 10 mg K6 wurden in 1 ml Ethanol (96%) gelöst und mit einem ml Reagenz versetzt. Der sich sofort bildende Niederschlag wurde nach 12 Stunden abfiltriert und zweimal aus Ethanol (96%) umkristallisiert.

6. Physikalische Untersuchungsmethoden

a. Schmelzpunkte

Die Substanzen wurden nach Trocknung unter Vakuum über Phosphorpentoxid mit dem Kofler Mikroheiztisch der Firma REICHERT (Wien) bestimmt. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

b. UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden mit dem SHIMADZU Graphicord UV-240 bei 20° C in Ethanol abs. aufgenommen.

c. Infrarot-Spektren

Die IR-Spektren wurden mit dem Spektralphotometer 257 der Firma PERKIN-ELMER aufgenommen. Die Substanzen lagen als KBr-Preßling vor.

d. Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit einem FINNIGAN MAT 212 mit SS 188 im Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt aufgenommen.

e. ^{1}H-NMR-Spektren

Die Aufnahme der Spektren von 5-Hydroxymethyl-furfural erfolgte mit einem BRUKER WH 60 des Instituts für Organische Chemie der Universität Frankfurt. Die anderen Spektren wurden mit einem BRUKER WH 90 im Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt aufgenommen.

f. ^{13}C-NMR-Spektren

Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem BRUKER WH 270 im Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt.

g. Optische Drehung

Die optische Drehung wurde mit einem Polarimeter 141 der Firma PERKIN-ELMER bei 20° C bestimmt.

h. Verteilungskoeffizienten

Zur Bestimmung des VK wurde jeweils ca. 3-5 mg Substanz genau gewogen in einem 10 ml Meßkolben in 10,0 ml n-Octanol gelöst. 1 ml der Lösung wurde in einen 25 ml Meßkolben pipettiert und der Kolben mit n-Octanol aufgefüllt. In einem 100 ml Jodzahlkolben wurden 10,0 ml dieser Lösung mit 10,0 ml Phosphatpuffer pH 7 versetzt und eine Stunde lang in einem Wasserbad von 20° C geschüttelt. Der VK errechnete sich dann aus dem Extinktionsverhältnis der organische Phase vor und nach dem Ausschütteln, gemessen jeweils bei einer Temperatur von 20° C. Die Extinktionen wurden bei Didrovaltratum bei 208 nm, Valtroxal bei 276 nm, Baldrinal bei 287 nm, K4 bei 252 nm und K6

bei 283 nm gemessen. Die Extinktionsmessung bei 208 nm war, wie ein Spektrum zeigte, trotz der leichten Eigenabsorption des Lösungsmittels bei dieser Wellenlänge noch möglich.

i. Elementaranalyse

Die CH-Analyse wurde im Institut Chemie für Mediziner im Klinikum Niederrad der Universität Frankfurt mit einem "Elementaranalyser" Modell 1104 der Firma CARLO ERBA durchgeführt.

7. Pharmakologische Untersuchungen

a. Bestimmung der LD_{50}

Die akute Toxizität wurde an Gruppen von jeweils fünf männlichen weißen NMRI-Mäusen (Fa. IVANOVAS, Kisslegg i. Allgäu), die wie unter Punkt 7.d beschrieben synchronisiert wurden, bestimmt. Pro Dosis wurden zehn Tiere mit einem Gewicht zwischen 15 und 20 g verwendet. Die einzelnen Substanzen wurden etwa um 10 Uhr als wäßrige Suspension i.p. bzw. p.o. appliziert. Das Ergebnis wurde am nächsten Morgen zur gleichen Zeit ermittelt. Zur Herstellung der Suspension wurden die Substanzen zuerst mikronisiert (Schwingmühle der Firma PERKIN-ELMER) und dann in einem Achatmörser mit physiologischer Kochsalzlösung suspendiert bzw. gelöst. Als Stabilisator dienten jeweils 25 mg/kg Tween 80®. Die jeweils frisch hergestellte Lösung bzw. Suspension wurde vor der Applikation fünf Minuten lang mit einem BRANSONIC 221 Ultraschallbad homogenisiert. Das applizierte Volumen betrug pro Gramm Maus 0,01 ml. Die Auswertung erfolgte nach LITCHFIELD und WILCOXON (1965) mit einem COMMODORE Mikrocomputer 3032 unter Verwendung eines Basic-Programms der Firma PID (Frankfurt).

b. Antagonismus gegenüber Acetylcholin an der isolierten Ileum-Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchens

Als Versuchstiere dienten männliche Meerschweinchen mit einem Gewicht von 350-450 g. Die Tiere wurden durch Nackenschlag getötet und durch die Halsschlagader entblutet. Nach Eröffnung des Bauchraumes wurde ein längeres Stück des terminalen Ileums entnommen und in eine Petrischale mit vorgewärmter Tyrodelösung[+)] gelegt, die mit Carbogen (95% O_2 und 5% CO_2) begast wurde. Aus dem Darmstück wurde die Longitudinalmuskulatur herauspräpariert und ein 2-3 cm langer ungedehnter Abschnitt mit zwei Fäden an einem DMS-Aufnehmer befestigt. Der DMS-Aufnehmer wurde in ein mit 60 ml Tyrode-Lösung von 32° C gefülltes Organbad gehängt. Nach etwa 30 Minuten wurde die Ileummuskulatur mit 400 mg belastet, womit eine leichte Dehnung erreicht wurde. Die Tyrodelösung wurde alle 10 Minuten erneuert.

Die Testsubstanzen (Acetylcholin und K4) wurden, in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, dem Organbad zugesetzt. Die Kontraktionen des isolierten Darms wurden über den DMS-Aufnehmer mit einem Direktschreiber (Breitbandschreiber der Firma RIKADENKI, Vorverstärker Programm 19 der Firma HELLIGE) registriert.

c. Antihistaminische Wirkung an der isolierten Ileum-Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchens

Die Versuchsanordnung und Durchführung entsprach der Untersuchung auf die akute spasmolytische Aktivität. Als Spasmogen wurde Histamindihydrochlorid verwendet.

[+)] Zusammensetzung der Tyrodelösung:
8,0 g NaCl, 1,0 g $NaHCO_3$, 0,2 g KCl, 0,2 g $CaCl_2$, 0,1 g $MgCl_2$, 0,05 g NaH_2PO_4, 1,0 g Glucose, Aqua dest. ad 1000 ml

d. Die Beeinflussung der Motilität bei der Maus

Die Bestimmung der Spontanmotilität wurde mit männlichen NMRI-Mäusen der Firma Dr. IVANOVAS (Kisslegg/Allgäu) durchgeführt. Die Tiere mit einem Gewicht von anfangs 10-12 g wurden sofort nach Lieferung nach dem Zufallsprinzip in Gruppen zu fünf Tieren in Makrolon®-Käfige (370 x 210 x 150 mm) verteilt. Alle Tiere wurden in einem gegen äußere Einflüsse weitgehend abgeschirmten Raum mit konstanter Temperatur (23° C) unter kontrollierten Licht-Dunkel-Bedingungen (L:D = 12:12 Std., Licht 07^{00}-19^{00} Uhr MEZ, Beleuchtungsintensität 200 Lux; Dunkelheit 19^{00}-07^{00} Uhr MEZ, Beleuchtungsintensität < 0,1 Lux, gemessen mit einem VDTI Optometer 40 A) gehalten. Zur Synchronisation verblieben die Tiere dort in der Regel mindestens 7 Tage vor Versuchsbeginn, wobei sie ein Gewicht zwischen 20-25 g erreichten. Futter (pelletiert, HOPE FARM, Niederlande) und Wasser (reines Leitungswasser) wurden auch während des Versuchs ad libitum gegeben. Die Käfigreinigung und Erneuerung von Futter und Wasser erfolgten jeden zweiten Tag - während der Versuche nur am Vormittag des Kontrolltages - zu unterschiedlichen Tageszeiten, um Koordinierungseinflüsse im Sinne eines zusätzlichen Zeitgebers zu vermeiden (KRIEGER, 1974). Zu anderen Zeiten wurde der Tierraum nicht betreten.

Bei den Versuchen mit i.p. Applikation wurden die Messungen mit einem 2-Kanal Animex Motimeter der Firma LKB (Stockholm) durchgeführt, wobei nur der Kanal A mit einer Empfindlichkeit von 47 mA verwendet wurde. Der Drucker befand sich zur Vermeidung störender Geräusche in einem Nebenraum. Bei den Versuchen mit p.o. Applikation wurde zusätzlich noch ein 2-Kanal Motilitätsmeßgerät der Firma RHEMA-LABORTECHNIK (Hofheim) verwendet, wobei ebenfalls nur der Kanal A verwendet wurde. Dabei wurde durch Vorversuche mit gegeneinander ausgetauschten Tiergruppen das Rhema-Gerät an das Animex-Gerät in seiner Empfindlichkeit angeglichen. Bei einer Einstellung des Rhema-Geräts auf Stufe 6 betrugen die Differenzen zwischen beiden Geräten bei kumulativer Addition aller nächlichen Impulse weniger als ± 10%; auch zwischen den circadianen Motilitäts-

kurven waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar. Die geringen Empfindlichkeitsunterschiede der Geräte spielten aber auch keine Rolle, da für die Versuche als Kontrolle die jeweils mit demselben Gerät gemessenen Motilitätsimpulse des dem Versuchstag vorangegangenen Tags verwendet wurden.

Am Vormittag des Kontrolltags wurden die Mäusegruppen mit einer konstanten Menge an frischem Streumaterial (250 ml ≙ ca. 5 mm Höhe im Käfig) auf die Meßplatten gesetzt. Die Motilitätsmeßimpulse wurden vom Impulszähler gesammelt und vom Drucker zu jeder halben Stunde ausgedruckt. Um 19^{30} Uhr MEZ des folgendes Versuchstags wurden die Testsubstanzen appliziert, wozu die Tiere in ihrem Käfig gruppenweise in einen Nebenraum gebracht wurden, um die übrigen Versuchstiere nicht durch Streß- und Schmerzsignale zu beeinflussen (HAUS et al., 1974). Die Herstellung der Testlösungen bzw. Suspensionen erfolgte wie unter 7.a beschrieben, wobei auf den Zusatz von Tween 80® bis auf die erwähnten Ausnahmen verzichtet wurde. Am nächsten Vormittag wurde der Versuch beendet, wobei die Auswertung der Motilitätsdaten immer nur bis 7^{00} Uhr MEZ erfolgte.

Die Datenverarbeitung erfolgte mit einem COMMODORE-Mikrocomputer 3032 des Instituts für Pharmazeutische Technologie der Universität Frankfurt durch ein spezielles Basic-Programm (Fa. PID, Frankfurt). Nach Dateneingabe erfolgte die Speicherung der Daten für Kontroll- und Versuchstag jeweils getrennt unter eigener Bezeichnung auf einer floppy-disk. Mit Abschluß des fünften Versuchs für eine Dosis einer Applikationsform erfolgte jeweils die Datenverarbeitung.Diese erfolgte in der Weise,daß jeweils aus den entsprechenden halbstündlichen Meßimpulsen die Mittelwerte von Versuchs- und Kontrollnächten errechnet wurden.Daran schlossen sich die Berechnung der entsprechenden Standardabweichungen und die Signifikanzberechnung durch den einseitig ungepaarten t-Test nach Student an.Die Mittelwerte der Meßimpulse dienten ebenfalls zur Berechnung der prozentualen Motilität in der Versuchsnacht gegenüber dem entsprechenden Halbstundenwert in der Kontrollnacht (=100%). Die relative Standardabweichung der prozentualen motorischen Aktivitäten dagegen beruht auf den halbstündlichen Meßimpulsen

der Versuchsnacht in Prozent der jeweiligen Eigenkontrolle der fünf Versuche.Wahlweise erfolgte ein Ausdruck der Daten oder die Zeichnung von Motilitätskurven durch den angeschlossenen Plotter.
Alternativ konnten diesen statistischen Berechnungen auch eine kumulative Addition der halbstündlichen Motilitätsimpulse von Kontroll- und Versuchstag, jeweils in Schritten von einer halben Stunde, beginnend um 19^{30} Uhr - dem Applikationszeitpunkt - und endend um 5^{30} Uhr (10 Stunden), vorausgehen.

Herrn Amtsrat H. Becela und Herrn Obergartenmeister H. Grasmück danke ich für den Anbau der Roten Spornblume im Botanischen Garten der Universität Frankfurt/Main.

V. LITERATURVERZEICHNIS

ASCHOFF, J.: Gesetzmäßigkeiten der biologischen Tagesperiodik; Dtsch. Med. Wochenschr. 88, 1930-1937 (1963)

BECKER, H. und R. SCHRALL: Valepotriates in tissue cultures of nine different Valerianaceae species in comparison to literature data of the intact plants; Journ. Nat. Prod. (Lloydia) 43, 721-723 (1980)

BERGER, F.: Handbuch der Drogenkunde; Band V, Wilhelm Maudrich Verlag Wien, Bonn, Bern 1960 S. 501

BEYER, H. und W. WALTER: Lehrbuch der organischen Chemie, 19. Auflage S. 281, 282, 684; S. Hirzel Verlag, Stuttgart 1981

BOETERS, U.: Behandlung vegetativer Regulationsstörungen mit Valepotriaten (Valmane®); Muench. Med. Wochenschr. 111, 1873-1876 (1969)

BOUNTHANH, C., C. BERGMANN, J.P. BECK, M. HAAG-BERRURIER und R. ANTON: Valepotriates, a new class of cytotoxic and antitumor agents; Planta Med. 41, 21-28 (1981)

BRACKEN, H.v. und G. WEIDEMANN: Arzneim.-Forsch. 3, 292 (1953) aus E. Gildemeister und Fr. Hoffmann: Die Ätherischen Öle; Band I, 4. Aufl., Akademie Verlag, Berlin 1956 S. 184

BRAUN, R., W. DITTMAR, M. MACHUT und S. WEICKMANN: Valepotriate mit Epoxidstruktur - beachtliche Alkylantien; Dtsch. Apoth. Ztg. 122, 1109-1113 (1982)

CIONGA: Séance de l'Acad. d. Sci. 25, 3 (1935) aus F. Berger: Handbuch der Drogenkunde, Band V, Wilhelm Maudrich Verlag Wien, Bonn, Bern 1960 S. 497

DENEE, R., R. BOS and B. HAZELHOFF: Isolation and structure elucidation of isovaltral, a decomposition product of isovaltrat; Planta Med. 37, 45-48 (1979)

EICKSTEDT, K.-W.v. und S. RAHMAN: Psychopharmakologische Wirkungen von Valepotriaten; Arzneim.-Forsch. 19, 316-318 (1969)

EICKSTEDT, K.-W.v.: Die Beeinflussung der Alkohol-Wirkung durch Valepotriate; Arzneim.-Forsch. 19, 995-997 (1969)

ENDO, T. and H. TAGUCHI: The constituents of valeran root. The structure of four new iridoid glycosides, Konokoside A, B, C and D from the root of "Hokkai-kisso"; Chem. Pharm. Bull. 25, 2140-2142 (1977)

ENGLER, A.: Syllabus der Pflanzenfamilien, 12. Auflage, S. 475; Gebr. Borntraeger, Berlin 1964

FINK, C.: Analytik, Pharmakokinetik und pharmakologische Wirkung der Valepotriate unter besonderer Berücksichtigung des Valtrats; Dissertation, Marburg 1982

FUNKE, E,-D. und H. FRIEDRICH: Valepotriate in oberirdischen Organen weiterer Arten der Valerianaceen; Planta Med. 28, 215-224 (1975)

GRAF, E. und B. BORNKESSEL: Analytische und pharmazeutisch-technologische Versuche mit Baldrian; Dtsch. Apoth. Ztg. 118, 503-508 (1978)

GRISA: Dissertation, Bonn 1873 aus E. Gildemeister und Fr. Hoffmann: Die Ätherischen Öle; Band I. 4. Aufl., Akademie Verlag, Berlin 1956 S. 179

GSTIRNER, F. und H. KIND: Pharmazie 6, 57 (1951) aus H. Wagner, K. Jurcic und R. Schaette: Vergleichende Untersuchungen über die sedierende Wirkung von Baldrian-extrakten, Valepotriaten und ihren Abbauprodukten; Planta Med. 38, 358-365 (1980)

HÄNSEL, R. und J. SCHULZ: GABA und andere Aminosäuren in der Baldrianwurzel; Arch. Pharm. 314, 380-381 (1981)

HAFFNER, F.: Münch. med. Wochenschr. 1, S. 271 (1929) aus F. Berger: Handbuch der Drogenkunde; Band V, Wilhelm Maudrich Verlag Wien, Bonn, Bern 1960 S. 500

HANDJIEVA, N. and V.G. ZAIKIN: DIA-Valtrate, a new valepotriate from Centranthus ruber (L.) DC; Planta Med. 34, 203-206 (1978)

HANDJIEVA, N., S. POPOV and N. MAREKOV: AHD-Valtrat, a new valepotriate from Centranthus ruber; Phytochemistry 17, 561-563 (1978)

HAUS, E., F. HALBERG, J.F.W. KÜHL und D.J. LAKUA: Chronopharmacology in animals; in: Chronobiological aspects of endocrinology (Hrsg. J. Aschoff, F. Ceresa, F. Halberg) F.K. Schattauer Verlag Stuttgart - New York 1974 S. 269

HAUSCHILD, F. in E. Gildemeister und Fr. Hoffmann: Die Ätherischen Öle; Band I, 4. Aufl., Akademie Verlag Berlin 1956 S. 178-187

HELLENBRECHT, D., B. LEMMER, G. WIETHOLD and H. GROBECKER: Measurement of Hydrophobicity, Surface Activity, Local Anaesthesia, and Myocardial Conduction Velocity as Quantitative Parameters of the Non-Specific Membrane Affinity of Nine β-Adrenergic Blocking Agents; Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 277, 211-226 (1973)

HENDRIKS, H., R. BOS, D.P. ALLERSMA, TH.M. MALINGRE and A.S. KOSTER: Pharmacological Screening of Valerenal and other Components of Essential Oil of Valeriana officinalis; Planta Med. 42, 62-68 (1981)

HENDRIKS, H., R. BOS, TH.M. MALINGRE und J. de VRIES: Der Einfluß von Valerenal und Valerensäuren aus Valeriana officinalis auf die Aktivität von Ratten und den Dopamin-Metabolismus im Rattengehirn; Planta Med. 45, 150 (1982)

HENRY, J.P., P.M. STEPHENS, J. AXELROD und R.A. MUELLER: Effect of psychosocial stimulation on the enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of noradrenaline and adrenaline; Psychosom. Med. 33, 227 (1971)

HÖLZL, J. und K. JURCIC: Valepotriate in den Blättern von Valeriana jatamansii; Planta Med. 27, 133-139 (1975)

HÖLZL, J.: Bedeutung von chemischen Rassen, Herkünften, Cultivars und Arten für die in vivo-Präparation radioaktiv markierter Naturstoffe, dargestellt am Beispiel von Valeriana; Planta Med. 28, 301-313 (1975)

HÖLZL, J., V.M. CHARI und O. SELIGMANN: Zur Struktur von drei genuinen Valtrathydrinen aus Valeriana tiliaefolia; Tetrahedron Lett. 15, 1171-1174 (1976)

HOLM, E., H. KOWOLLIK, A. REINECKE, G.E.v. HENNING, F. BEHNE und H.D. SCHERER: Vergleichende neurophysiologische Untersuchungen mit Valtrat/Isovaltrat und Extraktum Valerianae an Katzen; Med. Welt 31, 982-990 (1980)

INOUYE, H., S. UEDA and S. UESATO: Intermediacy of iridodial in the biosynthesis of some iridoid Glucosides; Phytochemistry 16, 1669-1675 (1977)

JURCIC, K.: Zur Biosynthese und Pharmakokinetik der Valepotriate von Valeriana wallichii; Dissertation, München 1974

KRIEGER, D.T.: Food and water restriction shifts corticosterone, temperature, activity and brain amine periodicity; Endocrino. 95, 1195 (1974)

KUCABA, W., P.W. THIES und E. FINNER: Isodidrovaltratum, ein neues Valepotriat aus Valeriana vaginata; Phytochem. 19, 575-577 (1980)

LAUFER, J.L., B.J. SECKEL and J.H. ZWAVING: Composition of the active principles of different Valeriana and Kentranthus species; Pharm. Weekbl. 105, 609-625 (1970)

LEMMER, B. and T. BERGER: Diurnal Variations in the Motor Activity of the Rat: Effects of Inhibitors of the Catecholamine Synthesis; Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 303, 251-256 (1978)

LEMMER, B., G. CASPARI-IRVING and R. WEIMER: Strain-Dependency in Motor Activity and in Concentration and Turnover of Catecholamines in Synchronized Rats; Pharmacology Biochemistry & Behaviour 15, 173-178 (1981)

LITCHFIELD, J.T. und F. WILCOXON: Bestimmung der LD_{50} und ED_{50} nach ...; nach L. Ther: Grundlagen der experimentellen Arzneimittelforschung, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m.b.H. Stuttgart 1965 S. 34-44 + 82-91

MANNETSTÄTTER, E., H. GERLACH und W. POETHKE: Phytochemische Untersuchungen an Kentranthus ruber DC; Pharmazie 21, 321 (1966)

MANNETSTÄTTER, E., H. GERLACH und W. POETHKE: Über die Inhaltsstoffe von Valerianaceen. 1. Mitt.; Pharm. Zentralhalle 106, 797-804 (1967)

MAYER, B. und E. SPRINGER: Psychoexperimentelle Untersuchungen zur Wirkung einer Valepotriatkombination sowie zur kombinierten Wirkung von Valtratum und Alkohol; Arzneim.-Forsch. 24, 2066-2070 (1974)

MAYERSBACH, H.v.: Time - a key in experimental and practical medicine; Arch. Toxicol. 36, 185 (1976)

NOLLE, I.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 145, 254 (1929) aus H. Wagner, J. Jurcic und R. Schaette: Vergleichende Untersuchungen über die sedierende Wirkung von Baldrianextrakten, Valepotriaten und ihren Abbauprodukten; Planta Med. 38, 358-365 (1980)

PETKOV, V. and O. MANOLOV: A Valepotriate Fraction from Valeriana officinalis with Tranquillizing and Antirhythmic Action; Vortragstagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, München (1976)

POPOV, S., N. HANDJIEVA and N. MAREKOV: A new valepotriate: 7-Epi-deacetylisovaltrate from Valeriana officinalis; Phytochemistry 13, 2815-2818 (1974)

POZO, F.del, F.V. DE FEUDIS and J.M. JIMENEZ: Motilities of isolated and aggregated mice; A difference in ultradian rhythmicity; Experientia 34, 1302-1304 (1978)

RENNER, A.: Die Wirkung des Baldrians; Dtsch. Med. Wochenschr. 63, 816-819 (1937)

SCHAETTE, R.: Zur Wertbestimmung, Pharmakologie und umweltbedingten Wirkstoffbildung von Radix Valerianae; Dissertation, München 1971

SCHILD, W.: Über die Valepotriate in Valerianaceen; Dissertation, Saarbrücken 1969

SCHILD, W. und W. SEITZ: Studien an Valerianaceen II: Valepotriate in südamerikanischen Arten; Ber. Dtsch. Bot. Ges. 84, 225-241 (1971)

SCHNEIDER, G. und M. WILLEMS: Neue Abbauprodukte der Valepotriate aus Kentranthus ruber (L.) DC; Arch. Pharm. 312, 555-557 (1979)

SCHNEIDER, G. und M. WILLEMS: Weitere Erkenntnisse über die Abbauprodukte der Valepotriate aus Kentranthus ruber (L.) DC; Arch. Pharm. 315, 691-697 (1982)

SCHROTTENBACH, : Med. Klinik 25, (1931) aus F. Berger: Handbuch der Drogenkunde; Band V, Wilhelm Maurich Verlag Wien, Bonn, Bern 1960 S. 502

STAHL, E. und W. SCHILD: Dünnschicht-Chromatographie zur Kennzeichnung von Arzneibuchdrogen, 4. Mitt. Baldrianwurzel, Valerianae Radix; Arzneim.-Forsch. 19, 314-316 (1969)

STAHL, E. und W. SCHILD: Über die Verbreitung der aequilibrierend wirkenden Valepotriate in der Familie der Valerianaceen; Phytochemistry 10, 147-153 (1971)

STAHL, E. und W. SCHILD: Isolierung von Didrovaltrat aus pakistanischen Baldrianwurzeln, Pharmazeutische Biologie, 4. Drogenanalyse II: Inhaltsstoffe und Isolierungen; G. Fischer Verlag Stuttgart - New York 1981 S. 355-357

STOLL, A., E. SEEBECK und D. STAUFFACHER: Medizin und Pharmazie, No. 1. Schweizer Apoth. Zeit. 95, 115 (1957); Helbigs Ann. Chem. 603, 158 (1957) aus F. Berger: Handbuch der Drogenkunde, Band V, Wilhelm Maudrich Verlag Wien, Bonn, Bern 1960 S. 495

THIES, P.W. und S. FUNKE: Über die Wirkstoffe des Baldrians; 1. Mitt. Tetrahedron Lett. 11, 1155-1162 (1966)

THIES, P.W.: Zur Chemie der Valepotriate; 4. Mitt. über die Wirkstoffe des Baldrians; Dtsch. Apoth. Ztg. 107 1411-1412 (1967)

THIES, P.W.: Die Konstitution der Valepotriate; 3. Mitt. über die Wirkstoffe des Baldrians; Tetrahedron Lett. 24, 313-347 (1968)

THIES, P.W.: Zum chromogenen Verhalten der Valepotriate; 5. Mitt. über die Wirkstoffe des Baldrians; Arzneim.-Forsch. 19, 319-322 (1969)

THIES, P.W.: Stereochemie des Didrovaltratum und Synthese einiger 2,9-Dioxatricyclo(4,3,1,$O^{3,7}$)decane; 8. Mitt. über die Wirkstoffe des Baldrians; Tetrahedron Lett. 35, 3087-3090 (1970)

THIES, P.W.: Valerosidatum, ein Iridoidesterglycosid aus Valeriana-Arten; 7. Mitt. über die Wirkstoffe des Baldrians; Tetrahedron Lett. 28, 2471-2472 (1970)

THIES, P.W.: In Pharmakognosie and Phytochemistry, Springer Verlag Berlin 1971 S. 47 aus R. Schaette: Zur Wertbestimmung, Pharmakologie und umweltbedingten Wirkstoffbildung von Radix Valerianae; Dissertation, München 1971

THIES, P.W., E. FINNER und F. ROSSKOPF: Über die Wirkstoffe des Baldrians - X; Die Konfiguration des Valtratum und anderer Valepotriate; Tetrahedron Lett. 29, 3213-3226 (1973)

THIES, P.W.: 8-Alkoxy-4-hydroxy-3-methyl-10-methylen-2,9-dioxatricyclo-(4,3,1,$O^{3,7}$)-decane sowie Verfahren zu ihrer Herstellung; Patentschrift Bundesrepublik Deutschland 1961433 (1974)

THIES, P.W.: Die absolute Konfiguration aus Valerosidatum und von Didrovaltratum; Tetrahedron 30, 2317-2325 (1974)

THIES, P.W., E. FINNER und S. DAVID: Über die Wirkstoffe des Baldrians; Planta Med. 41, 15-20 (1981)

TSCHIRCH, A.: Handbuch der Pharmakognosie; Zweiter Band, Abteilung 1, Verlag von Chr. Herm. Tauchnitz, Leipzig 1912 S. 523

VILLATORO, S.de: Mexikanische Heilpflanzen früher und heute; Vortrag beim mexikanisch-deutschen Symposium über Arzneipflanzen, Mexico (1979)

WAGNER, S.I.: Nord. med. Stockholm, 1942, 3322; zit. n. Ber. ges. Physiol. 134, 60 (1944) aus E. Gildemeister und Fr. Hoffmann: Die Ätherischen Öle; Band I, 4. Aufl., Akademie Verlag Berlin 1956 S. 184

WAGNER, H. und K. JURCIC: Über die spasmolytische Wirkung des Baldrians; Planta Med. 37, 84-86 (1979)

WAGNER, H. und K. JURCIC: In vitro- und in vivo-Metabolismus von ^{14}C-Didrovaltrat; Planta Med. 38, 366-376 (1980)

WAGNER, H., K. JURCIC und R. SCHAETTE: Vergleichende Untersuchungen über die sedierende Wirkung von Baldrianextrakten, Valepotriaten und ihren Abbauprodukten; Planta Med. 38, 358-365 (1980)

WALKER, C.: Implications of biological rhythms in brain amine concentrations and drug toxicity; in: Chronobiology (Hrsg. L.E. Scheving, F. Halberg, J.E. Pauly) Georg Thieme Verlag Stuttgart - Igaku Shoin Ltd. Tokyo 1974 S. 205-208

WALLICZEWSKI: Apoth. Zeit. 6, 186 (1891) aus F. Berger: Handbuch der Drogenkunde, Band V, Wilhelm Maudrich Verlag Wien, Bonn, Bern 1960 S. 496

WERZ, v. und HOMAN: Arch. exp. Path. Pharmak. 193, 272 (1939) aus E. Gildemeister und Fr. Hoffmann: Die Ätherischen Öle; Band I, 4. Aufl., Akademie Verlag Berlin 1956 S. 184

WILLEMS, M.: Chemische und pharmakologische Untersuchungen über Abbauprodukte des Valtrats; Dissertation, Frankfurt 1980

WINTERFELD, K.: Organisch-chemische Arzneimittelanalyse; Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt 1971 S. 29

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

H. Fasold, H. Hoffmann, H. Janecke, P. Junior, H. Linde, H.A. Müser, E. Mutschler, H. Oelschläger, G. Schneider, K. Thoma, G. Willuhn.

Lebenslauf von Jörg Veith

15. 1.1951	geboren in Bad Homburg Eltern: Klaus Veith und Hanny Veith, geb. Burkard
1. 4.1957	Volksschule Mitte Oberursel
1. 4.1961	Gymnasium Oberursel
11. 6.1970	Abitur
1. 8.1970	Apothekenpraktikum: 1. Apotheke des St. Markus-Krankenhauses in Frankfurt/Main
1. 8.1971	2. Holzhausen-Apotheke Frankfurt
22. 6.1972	Pharmazeutische Vorprüfung in Wiesbaden
1.10.1972	Wehrdienst: 1. San. Ausb. Komp. 15/II München
1. 1.1973	2. Institut für Wehrpharmazie und Lebensmittelchemie München
1. 1.1974 bis 31. 3.1976	Tätigkeit als Apothekerassistent in mehreren öffentlichen Apotheken
1. 4.1976	Pharmaziestudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt
17. 3.1978	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
28.11.1979	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
21. 1.1980	Approbation als Apotheker
2. 1.1980	Beginn der Anfertigung einer Dissertation bei Prof. Dr. G. Schneider, Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt
1.10.1980	Tätigkeit im Institut für Pharmazeutische Biologie als wissenschaftlicher Angestellter
1. 1.1981 bis 30. 9.1983	Tätigkeit im Institut für Pharmazeutische Technologie als wissenschaftlicher Angestellter

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353